

**MIRIAN TOMOKO MATSUNO CARVALHO**

**ESTUDO CLÍNICO E MICROBIOLÓGICO DE LEVEDURAS  
ISOLADAS DE PACIENTES COM AIDS E CANDIDÍASE ORAL**

Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre.

Curso de Pós- graduação em Medicina  
Interna, Setor de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Queiróz  
Telles Filho.

Co-orientador: Prof. Dr. Arnaldo Lopes  
Colombo

Curitiba

2000

ORIENTADOR:

**Prof. Dr. Flávio de Queiróz Telles Filho**

Prof. Adjunto do Departamento de Saúde Comunitária na Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Paraná.

CO-ORIENTADOR:

**Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo**

Prof. Adjunto do Departamento de Medicina na Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de São Paulo.

## Dedicatória

Aos meus pais, Hiroshi e Miti  
Ao meu marido, Saulo  
Aos meus queridos filhos Bettina e Fellipe



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Paraná  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA  
DOUTORADO

---

## **PARECER**

**PARECER CONJUNTO** dos Professores Dr. Arnaldo Lopes Colombo, Dr<sup>a</sup>. Maria Terezinha Carneiro Leão, e Dr. Flávio Queiroz Telles Filho sobre a Dissertação de Mestrado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada por Mirian Tomoko Matsuno Carvalho, intitulada: **“ESTUDO CLÍNICO E MICROBIOLÓGICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE PACIENTES COM AIDS E CANDIDÍASE ORAL “**

A Banca Examinadora considerou que Mirian Tomoko Matsuno Carvalho apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe: Conceito " A " , correspondente ao Grau " 10 " , sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de MESTRA EM MEDICINA e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 24 de novembro de 2.000.

  
Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

  
Profª. Drª. Maria Terezinha Carneiro Leão

  
Prof. Dr. Flávio Queiroz Telles Filho

## **Agradecimentos**

Aos amigos e técnicos do Laboratório Especial de Micologia da Escola Paulista de Medicina e especialmente ao Dr. Arnaldo Lopes Colombo pela orientação e incentivo na realização deste trabalho.

Aos amigos e técnicos do Laboratório de Micologia do HC- UFPr e ao Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho pelo apoio e orientação.

Ao professor Juarez Gabardo, do Departamento de Genética da UFPr pela orientação do estudo estatístico.

## SUMÁRIO

## PÁG.

LISTAS DE TABELAS .....	ix
LISTAS DE FIGURAS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Homeostasia da cavidade oral .....	1
1.2. Candidíase oral .....	5
1.3. Situação atual da AIDS .....	6
1.4. Candidíase oral e AIDS .....	10
2. OBJETIVOS .....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
3.1. Procedência dos pacientes .....	23
3.2. Critérios de inclusão e exclusão .....	23
3.3. Ficha epidemiológica e exame clínico .....	24
3.4. Coleta e processamento das amostras .....	25
3.5. Documentação microbiológica .....	26
3.5.1. Exame direto .....	26
3.5.2. Culturas .....	26
3.5.2.1. Semeadura .....	26
3.5.2.2. Meios utilizados .....	26
3.5.2.3. Processamento do material para identificação de leveduras e análise do perfil de suscetibilidade a antifúngicos .....	27
3.6. Isolamento .....	27
3.7. Identificação .....	28
3.7.1. Prova do tubo germinativo .....	28
3.7.2. Prova do clamidoconídio ou microcultivo .....	28
3.7.3. Prova de assimilação de hidratos de carbono e fontes de nitrogênio (auxanograma) .....	29
3.7.4. Prova de fermentação de açúcares (zimograma) .....	30
3.7.5. Pesquisa de ascosporos .....	30
3.7.6. Análise dos dados de identificação .....	30

<b>SUMÁRIO (cont.)</b>	<b>PÁG.</b>
3.7.7. Testes de suscetibilidade .....	31
3.7.7.1. Antifúngicos .....	31
3.7.7.2. Meio de cultivo .....	32
3.7.7.3. Preparo do inóculo .....	32
3.7.7.4. Diluição em caldo realizada em placa de microtitulação (microdiluição) .....	33
3.7.7.5. Análise dos resultados .....	34
3.8. Análise estatística .....	36
4. RESULTADOS .....	36
4.1. Características dos pacientes estudados .....	36
4.1.1. Comportamento de risco .....	37
4.1.2. Procedência .....	39
4.2. Infecções oportunistas .....	39
4.3. Candidíase oral .....	41
4.3.1. Candidíase oral e estado de conservação dentária .....	42
4.3.2. Episódios prévios de candidíase oral nas categorias de imunossupressão .....	43
4.4. Relação entre formas clínicas de candidíase oral e níveis de CD4 ....	44
4.5. Avaliação do uso de antifúngicos no tratamento de episódios prévios de candidíase oral .....	46
4.6. Diagnóstico laboratorial .....	48
4.6.1. Avaliação de dois métodos de coleta e processamento de amostras biológicas para diagnóstico de candidíase oral .....	48
4.6.2. Identificação de espécies isoladas .....	48
4.7. Perfil de suscetibilidade .....	49
5. DISCUSSÃO .....	52
6. COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES .....	62
7. ANEXOS .....	63
7.1. Anexo 1 .....	63
7.2. Anexo 2 .....	65
7.3. Anexo 3 .....	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69

<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>PÁG.</b>
TABELA 1 - Critérios de suscetibilidade a fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B .....	35
TABELA 2 - Características demográficas e laboratoriais de 59 pacientes com AIDS e candidíase oral .....	37
TABELA 3 - Tipo de exposição à AIDS segundo o sexo .....	38
TABELA 4 - Dados das infecções oportunistas concomitantes nos pacientes com AIDS .....	40
TABELA 5 - Episódios prévios de candidíase oral nos pacientes imunossuprimidos .....	43
TABELA 6 - Gravidade da candidíase oral e contagem de linfócitos T CD4 nos pacientes com AIDS .....	44
TABELA 7 - Estatística descritiva dos linfócitos TCD4 e análise comparativa em relação à gravidade .....	45
TABELA 8 -Avaliação do uso prévio de compostos azólicos e poliênicos tópicos na terapêutica da candidíase oral e contagem de linfócitos TCD4 nos pacientes com AIDS .....	47
TABELA 9 - Dados dos pacientes com AIDS em relação ao tratamento tópico e o uso de medicação .....	47
TABELA 10 – Perfil de suscetibilidade de <i>Candida albicans</i> aos antifúngicos .....	49
TABELA 11 - Perfil de suscetibilidade de <i>Candida albicans</i> aos antifúngicos conforme o nível de CD4 .....	50
TABELA 12 - Estatística descritiva do perfil de suscetibilidade e análise comparativa em relação aos antifúngicos .....	51



## LISTA DE FIGURAS

PÁG.

FIGURA 1 - Mapa do Estado do Paraná com as Regionais de Saúde .....	39
FIGURA 2 - Candidíase oral leve .....	42
FIGURA 3 - Candidíase oral grave .....	42
FIGURA 4 - Relação entre CD4 e gravidade da candidíase oral .....	46
FIGURA 5 - CHROMagar® <i>Candida</i> .....	49
FIGURA 6 - Perfil de suscetibilidade em relação aos níveis de CD4 .....	51

## RESUMO

### ESTUDO CLÍNICO E MICROBIOLÓGICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE PACIENTES COM AIDS E CANDIDÍASE ORAL

**OBJETIVO:** Avaliar os aspectos clínicos, demográficos e microbiológicos de 59 pacientes com AIDS e candidíase oral. Comparar a sensibilidade diagnóstica entre dois métodos de coleta de material da cavidade oral. Avaliar o perfil de suscetibilidade *in vitro* dos isolados, frente a diferentes drogas antifúngicas.

**MATERIAL E MÉTODOS:** Foram incluídos pacientes dos Serviços de Infectologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e Hospital Oswaldo Cruz, Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, de fevereiro de 1997 a junho de 1998. Critérios de inclusão: diagnóstico de AIDS, categoria clínica C, maiores de 18 anos, com presença de candidíase pseudomembranosa. Após avaliação clínica da cavidade oral, coleta de material para diagnóstico microbiológico através do método de bochecho e do *swab*. Exame micológico direto corado e cultivo em Ágar Sabouraud dextrose e CHROMagar® *Candida*. Identificação microbiológica das leveduras através da análise da micromorfologia e perfil bioquímico pelo Sistema de Identificação de Leveduras API 20C AUX® (BioMerriex). Análise do perfil de suscetibilidade aos agentes antifúngicos (fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B) dos isolados por método da microdiluição em caldo, de acordo com as normas de padronização do NCCLS, 1995.

**RESULTADOS:** Foram avaliados 59 pacientes com AIDS e candidíase oral, 44 masculinos e 15 femininos, com média de idade de 34 (22-49 anos). Todos os pacientes eram procedentes de Curitiba e Região Metropolitana, apresentando número de linfócitos T CD4 < 200/mm<sup>3</sup>, sendo que em 61% dos casos, a quantidade era menor que 50/mm<sup>3</sup>. Não se observaram diferenças significativas em relação à sensibilidade dos métodos de coleta do material orofaríngeo em relação à demonstração do agente etiológico ao exame micológico direto. Já o tempo para processamento do material coletado por bochecho foi maior que o coletado por *swab*. Foram isolados 60 amostras de leveduras do gênero *Candida*, 59 identificadas como *Candida albicans* apenas e uma associada a *C. (T.) glabrata*. Todas as amostras de *Candida* mostraram-se sensíveis aos antifúngicos testados.

**CONCLUSÕES:** O método tradicional (*swab*) para diagnóstico microbiológico de candidíase orofaríngea, oferece vantagens sobre a técnica do bochecho, proposta por alguns autores. O emprego de CHROMagar® *Candida* pode ser uma boa alternativa para identificação de espécies de *Candida*, entretanto um número maior de *Candida* não *albicans* deve ser analisado. A sensibilidade das amostras isoladas frente aos antifúngicos, parece não ter sido afetada, mesmo em pacientes que usaram antifúngicos prévios como fluconazol e cetoconazol.

## ABSTRACT

### CLINICAL AND MICROBIOLOGICAL STUDY OF YEASTS ISOLATED FROM PATIENTS WITH AIDS AND ORAL CANDIDIASIS

**OBJECTIVE:** To evaluate clinical, demographic and microbiological aspects of 59 patients with AIDS and oral candidiasis. To compare the diagnostical sensibility between two different methods for recovering material from oral cavity. To evaluate the isolates *in vitro* susceptibility to different antifungals.

**MATERIALS AND METHODS:** Patients from both Infectology Service, Clinical Hospital - Federal University of Parana, and Oswaldo Cruz Hospital, Health Secretary- State of Parana, were included, from February 1997 to June 1998. Inclusion criteria were: AIDS diagnostic, clinical category C, above 18 years, and presence of pseudomembranous candidiasis. After a clinical evaluation of oral cavity, material was obtained to microbiological diagnostic through two parallel methods: oral rinses and swabs. Direct micologic stain was examined and cultured in both Sabouraud dextrose agar and CHROMagar®Candida. Yeasts were identified by micromorfology analyses and biochemical pattern through API20C AUX® (BioMerrieux). Susceptibility pattern of isolates to antifungals (fluconazole, itraconazole, ketoconazole, and amphotericin B) was analyzed through the broth microdilution method, developed by the NCCLS, 1995.

**RESULTS :** We analyzed 59 patients with AIDS and oral candidiasis, 44 male and 15 female, mean age 34 (22-49) years. All patients, proceeding from Curitiba and region, presented lymphocyte T CD4+ counts <200/mm<sup>3</sup>; in 61% of cases <50/mm<sup>3</sup>. There were no significant differences between the sensibility of the two collecting methods, oral rinses and swab, in demonstrate the etiological agent on direct microscopy. Oral rinses processing of samples demonstrated to be less rapid than swabs. We isolated 60 yeast samples, 59 identified as *Candida albicans* alone, and one was associated with *C. (T.) glabrata*. All *Candida* samples were susceptible to all antifungals tested.

**CONCLUSIONS:** The traditional swab method demonstrated to be more useful than oral rinses for the microbiological diagnostic of oral candidiasis as suggested by some authors. The selective medium CHROMagar® Candida, was a good choice for *Candida* species identification, otherwise it should be analyzed a greater number of *Candida non albicans* samples. Antifungal susceptibility was not affected by previous antifungal utilization, as fluconazole and ketoconazole.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Homeostasia da cavidade oral

A colonização microbiana do recém-nascido começa imediatamente após o nascimento; a criança é colonizada pela microbiota derivada do trato genital materno e a seguir por outros contatos humanos e objetos inanimados, incluindo microrganismos tais como corinebactérias, lactobacilos, coliformes, micrococos, estreptococos, anaeróbios facultativos, cocos anaeróbios, protozoários, leveduras e algumas vezes vírus (MACKOWIAK, 1982; PARK & YAACOB, 1994).

A cavidade oral do recém-nascido é considerada estéril até pelo menos a primeira respiração, seguida por um rápido aumento de microrganismos dentro de oito horas. Enquanto o indivíduo se desenvolve, a microbiota oral se modifica quantitativa e qualitativamente e aos três meses existe uma microbiota residente identificável, sofrendo sua maior modificação aos seis meses da dentição decídua. Isto propicia oportunidade para o estabelecimento e crescimento de microrganismos mais adaptados a esse nicho, pertencentes aos gêneros: *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Stomatococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Arachnia*, *Rothia*, *Propionibacterium*, *Bacterionema*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Eikenella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Wolinella*, *Capnocytophaga*, *Selenomonas*, *Campylobacter*, *Treponema* e *Candida*. Quando a erupção dentária se completa, o número de microrganismos na cavidade oral alcança seu crescimento exponencial, atingindo cerca de 300 espécies (PARK & YAACOB, 1994; SOCRANSKY & MANGANIELLO, 1971).

A longevidade da dentição humana acompanha a duração da vida; se, contudo, os dentes são perdidos em decorrência de cáries, doença periodontal ou trauma, a composição da microbiota é revertida àquela existente antes da emergência da dentição decídua. A reposição da perda dentária por próteses estimula a reemergência de microrganismos residentes de superfície, tais como, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, junto com lactobacilos e leveduras. A cavidade oral constitui, pois, ambiente ideal para o crescimento e manutenção

de microrganismos, que requerem calor, umidade e suprimento contínuo de nutrientes, provenientes da passagem de alimentos, saliva e fluido gengival. Por outro lado, o número de microrganismos residentes é controlado através da secreção de fatores antimicrobianos salivares, competição por nutrientes, exfoliação das células epiteliais e deglutição da saliva, que promovem a sua remoção e a limitação da sua taxa de crescimento. O homem encontra-se em constante associação e adaptação com essa complexa microbiota, constituída basicamente por bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos do gênero *Candida*. O equilíbrio dessa associação é determinado por múltiplos fatores, como: secreção salivar, potencial de óxido-redução, nutrição e metabolismo microbiano, higiene oral, doenças sistêmicas, tabagismo, dieta, interações micorbianas, doenças dentárias e orais, fatores genéticos e raciais, condições hormonais, aspectos anatômicos, drogas e agentes antimicrobianos, adesão microbiana e tratamento dentário (PARK & YAACOB, 1994).

A microbiota normal forma uma camada densa de bactérias, cobrindo o epitélio mucoso e formando uma barreira física entre mucosa e leveduras, que interfere com o processo de adesão desses microrganismos às células epiteliais (GHANNÓUM, 1988). BALISH & PHILLIPS, 1966, relatam a importância da microbiota normal, para a proteção contra infecção por *Candida*, indicando que a competição entre os microrganismos favorece a homeostasia da cavidade oral.

A saliva na cavidade oral é uma mistura de secreções das glândulas parótidas, submandibulares, sublinguais e outras glândulas menores que se localizam nas mucosas jugal e palatina (ERICSON & MAKINEN, 1988; PARK & YAACOB, 1994). A saliva forma fina camada de líquido, com espessura normal de 1 a 10 $\mu$ m, sobre diferentes superfícies, de modo que sua quantidade na cavidade oral, em qualquer ocasião, é de aproximadamente 0,5mL. O pH normal da saliva, em adultos varia de 6,2 a 7,4. Seus principais eletrólitos são: flúor, iodo, potássio, sódio, cloro, fosfato inorgânico, bicarbonato, cálcio, magnésio e íon tiocianeto (ERICSON & MAKINEN, 1988). Os principais constituintes orgânicos são as proteínas, cuja concentração varia de 0,1 a 0,2%, sendo importantes na formação de película, aderência bacteriana e equilíbrio iônico ao nível da superfície dentária

(ERICSON & MAKINEN, 1988; PARK & YAACOB, 1994). Todas as enfermidades ou medicações que reduzem a circulação periférica, mudam o equilíbrio hídrico, interferem no metabolismo basal ou nas funções neurorreceptoras, provocam diminuição do fluxo e alteração da composição salivar. A saliva desempenha as funções de lubrificação e manutenção das condições fisiológicas dos tecidos orais, sistema tampão, remineralização, ativação enzimática, manutenção da estabilidade enzimática e de defesa através dos seus vários sistemas antimicrobianos (CHALLACOMBE, 1994; ERICSON & MAKINEN, 1988). A importância da saliva na proteção contra a candidíase oral pode ser deduzida pela elevada frequência de candidíase em pacientes com síndrome de Sjögren (CHALLACOMBE, 1994).

Entre os fatores antimicrobianos salivares, atribui-se grande relevância às histatinas, secretadas pelas glândulas parótidas e submandibulares (OPPENHEIM et alii, 1988). As histatinas são polipeptídios ricos em histidina (HRP), capazes de destruir blastoconídios e de inibir a germinação das leveduras, exercendo, portanto, ação fungicida e fungistática, além de atividade antibacteriana (OPPENHEIM et alii, 1988; XU et alii, 1990). A destruição dos blastoconídios está relacionada à perda de potássio e de outros íons essenciais da célula, sugerindo que esses polipeptídios alteram a permeabilidade da membrana celular. As histatinas também promovem outros eventos intracelulares, essenciais, como a ribosilação do ADP ou alteração da expressão de genes, que resultam na morte celular. A inibição da germinação de blastoconídios requer a adesão das histatinas à membrana celular, seguida pela sua internalização, formando complexos de histatinas associados a proteínas ligantes citosólicas e nucleares que agem como fatores que inibem a expressão do gene envolvido no dimorfismo da forma leveduriforme para a forma micelial de *Candida albicans* (XU et alii, 1990).

A ação proteolítica da saliva pode levar à degradação das histatinas na cavidade oral. A alta atividade proteolítica oral está claramente relacionada ao aumento do acúmulo de placa e a ocorrência concomitante de gengivite, frequente em pacientes imunossuprimidos. Adicionalmente, a presença de infiltrado

inflamatório ou lesões destrutivas das células glandulares podem contribuir para a modificação da concentração dessas proteínas. A presença constante de histatinas na cavidade oral permite a prevenção da infecção fúngica, sendo considerada a primeira linha de defesa contra a candidíase oral. A redução transitória dos níveis de histatinas na cavidade oral correlaciona-se com o início de um episódio de candidíase (XU et alii, 1991). Outros fatores antimicrobianos inespecíficos incluem lisozima, lactoperoxidase, calprotectina e lactoferrina (STEINBAKK et alii, 1990; MÜLLER et alii, 1993; CHALLACOMBE, 1994).

A proteção imunológica das mucosas é mediada em grande parte pela imunoglobulina A (IgA), que inibe a aderência e penetração de microrganismos, inclusive de *C. albicans*, às células epiteliais da mucosa (VUDHICHAMNONG, WALKER, RYLEY, 1982).

O epitélio da cavidade oral contém todos os elementos celulares para suporte e manutenção de resposta imune efetiva. Uma população de células reside subjacente à camada de células epiteliais em uma coleção de tecido conectivo frouxo conhecido como lâmina própria: linfócitos, eosinófilos, granulócitos, macrófagos e células plasmáticas. Uma segunda população de células linfóides reside entre as células epiteliais composta por células de Langerhans e linfócitos T com marcadores CD4 e CD8 positivos em número aproximadamente igual. A apresentação do antígeno pode ocorrer através das células de Langerhans no epitélio, ou se o antígeno penetra no tecido conectivo, através das células da linhagem macrófágica. Os linfócitos intraepiteliais mostram função de citotoxicidade mediada por célula espontânea, citotoxicidade celular dependente de anticorpo e citotoxicidade celular induzida por mitógeno. (CHALLACOMBE, 1994; MC NABB & TOMASI, 1981).

A resposta imune celular a um fungo requer uma célula apresentadora de antígeno, em geral um fagócito mononuclear, que processa e apresenta o antígeno fúngico ao linfócito T com marcador CD4. Linfócitos específicos que expressam receptores para os antígenos são gerados, e liberam citocinas como Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2), que ativam as células

efetoras (fagócito mononuclear ou polimorfonuclear) que irá fagocitar e destruir o fungo (LEVITZ, 1992 ; LOURIA & BRAYTON, 1964 ).

## 1.2. Candidíase oral

A candidíase oral foi reconhecida como entidade clínica desde o tempo de HIPÓCRATES, que a descreveu em associação com uma doença subjacente grave no século IV A.C. (LYNCH, 1994). Em 1846, Berg foi o primeiro investigador a adequadamente descrever a relação entre *Candida albicans* e candidíase oral (LYNCH, 1994). Em 1923, Berkout propõe o nome *Candida* do latim “toga candida” que se referia à roupa branca usada pelos candidatos ao senado romano e *albicans* do latim “al bicare” que significa “branquear”. O termo monilíase é incorreto e desde 1982, foi excluído pela Sociedade Americana de Microbiologia através do *Index Medicus*. O gênero *Monilia* não se relaciona à doença, sendo considerado um fungo contaminante do ar (LYNCH, 1994; ODDS, 1988).

Entre os fungos, *Candida* é o gênero predominante na microbiota da cavidade oral (PARK & YAACOB, 1994), sendo eventual o isolamento de outras leveduras, como *Trichosporon* (CANDIDO, AZEVEDO, ITO, 1995). A prevalência de colonização da cavidade oral por leveduras em indivíduos normais é muito variável na literatura. Índices de 5 a 60%, com média em torno de 40%, têm sido relatados (CANDIDO, AZEVEDO, ITO, 1995; CHALLACOMBE, 1994; LYNCH, 1994; MEUNIER, 1989; SAMARANAYAKE, 1992). *C. albicans* é a espécie mais prevalente (DATRY, 1992; LYNCH, 1994); mas outras são referidas, ocasionalmente, na cavidade oral (ROSEFF & SUGAR, 1993). Além de *C. albicans*, responsável por 95% dos isolamentos (DATRY, 1992), pode-se recuperar em lesões orais de pacientes com e sem AIDS: *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. (Torulopsis) glabrata* (CANDIDO, AZEVEDO, ITO, 1995; DATRY, 1992; PARK & YAACOB, 1994). As leveduras colonizam preferencialmente, a língua, seguida pelo palato e mucosa jugal (ARENDORF & WALKER, 1980). Caso haja ruptura do equilíbrio local, ou ainda disfunção hormonal ou do sistema imune, o indivíduo passa do estado de portador (forma



comensal) à doente (forma patógena) (LYNCH, 1994; PARK & YAACOB, 1994). Segundo ODDS (1988), infecções, disfunções endócrinas, imunodeficiências, neoplasias, extremos de faixa etária, gestação, dietas ricas em carboidratos e hipovitamínicas, uso de próteses dentárias, administração de contraceptivos, corticosteróides, antibióticos e agentes imunossupressores seriam os principais fatores relacionados com candidíase. Alguns autores admitem que a candidíase, a princípio, não coloca em risco a vida do doente; no entanto serve como marcador clínico para disfunções subjacentes (LYNCH, 1994).

A candidíase oral pode assumir uma variedade de formas clínicas, dentre as mais comumente, utilizada divide as lesões clínicas em três categorias: aguda, crônica e mucocutânea. A candidíase aguda é subdividida em pseudomembranosa e forma atrófica. Candidíase crônica inclui as variantes atróficas e hiperplásicas. Candidíase mucocutânea, pode ser localizada, familiar ou relacionado à síndrome.

A candidíase pseudomembranosa aguda constitui, por excelência, a apresentação clássica, onde são observadas placas esbranquiçadas, que, ao serem removidas, expõem área eritematosa e, por vezes, sangrante. A forma atrófica aguda caracteriza-se pela presença de eritema e dor em queimação, ao passo que a candidíase atrófica crônica, apresenta-se sob a forma de mucosite eritematosa, algumas vezes assintomática, em indivíduos portadores de prótese dentária. A queilite angular associa-se freqüentemente a essa forma clínica. A variante hiperplásica crônica está relacionada com o tabagismo e não raro é acompanhada por atipia epitelial ou degeneração maligna do tecido. A candidíase mucocutânea, forma exuberante, marcada pela presença de lesões multifocais, associa-se com alguma forma de imunodeficiência celular (LYNCH, 1994).

### **1.3. Situação atual da AIDS**

Desde que foram descritos os primeiros casos de AIDS em 1981, a infecção por HIV tem aumentado a níveis de pandemia, alcançando distribuição mundial. Atualmente, esta doença é uma das principais causas de morte entre homens e mulheres com menos de 45 anos de idade e de crianças com menos de

cinco anos, em países desenvolvidos. A epidemia disseminou-se para áreas geográficas anteriormente poupadas, como os países do sul e sudeste da Ásia e infiltrou-se em zonas rurais e regiões mais carentes do mundo. Na evolução desta pandemia, até julho de 1991, havia 371.082 casos de AIDS comunicados à OMS, para uma estimativa real de 1.000.000 de adultos e 500.000 crianças doentes. Em meados de 1995, o número de notificações era de aproximadamente 800.000 casos com estimativa real de 4.500.000 casos de AIDS entre adultos e crianças. (WHO-AIDS, 1993). Nos EUA, estima-se haver, hoje, 500.000 casos de AIDS, tendo sido relatados 10% deles entre 1981-1987, 41% entre 1988-1992 e 49% entre 1993 e 1995. Os homossexuais e bissexuais permanecem como a maior população de infectados pelo HIV e já se observa tendência estacionária na incidência de casos nesses grupos. A taxa de usuários de drogas injetáveis ilícitas que se tornam infectados é crescente, tendo aumentado de 17% entre 1981 e 1987, para 27% entre 1993-1995, tendo como consequência um aumento de casos na população heterossexual envolvida na pandemia, que também aumentou de 3% para 10% (CDC-AIDS,1995). Na Europa, Austrália e Nova Zelândia, tem havido redução do número de casos entre homossexuais e bissexuais, com aumento da transmissão heterossexual, principalmente pela alta taxa de infecção entre os usuários de drogas injetáveis ilícitas que mantêm relações sexuais com pessoas não usuárias de drogas (WHO- AIDS,1993).

Na África na região sub-sahariana, se concentram aproximadamente dois terços dos casos de AIDS do mundo. Algumas regiões apresentam até um terço da população sexualmente ativa infectada pelo HIV, havendo um marcante aumento do número de infectados entre gestantes, homens portadores de DST e prostitutas. Entre estas últimas a incidência pode chegar a mais de 80% (WHO-AIDS,1993) e a soro-prevalência em mulheres HIV+ varia de 5 a 35% com as maiores taxas em Blantyre, Kampala, Lusaka, Kinshasa e Abidjan. Sendo a AIDS a causa mais importante de óbito entre adultos em Abidjan, Kinshasa e comunidades rurais em Uganda e Tanzânia (QUINN,1996).

Na Ásia, há grande aumento no registro de casos de infecção pelo HIV, sobretudo nas regiões sul e sudeste. A disseminação, inicialmente, deu-se a

partir dos usuários de drogas injetáveis ilícitas, principalmente na Tailândia, Mianmar, nordeste da Índia e Malásia. Logo, a transmissão heterossexual passou a ser a principal forma de disseminação, sobretudo entre as prostitutas (WHO-AIDS,1993).

Na América Latina e Caribe as vias de transmissão são muito variadas. O homossexualismo, e bissexualismo têm sido o principal modo de transmissão com aumento progressivo de casos em heterossexuais e usuários de drogas injetáveis ilícitas. O número de mulheres infectadas aumenta substancialmente e declina a predominância do sexo masculino entre os casos de infectados pelo HIV.

No Brasil, a AIDS foi introduzida tão precocemente quanto nos EUA. Até 03 de junho de 2000, foram notificados pelo Ministério da Saúde 190.949 casos de AIDS, entre crianças e adultos. Desses 6.750 são crianças, 139.502 são adultos do sexo masculino e 4.697 do sexo feminino (BRASIL, 2000). A unidade federada com maior número de casos é São Paulo, com 91.319 casos acumulados desde o início da epidemia, sendo que o Paraná apresenta 7.607 casos de AIDS acumulados, com 3.578 casos em Curitiba, 733 casos em Londrina e o restante em localidades como Paranaguá, Ponta Grossa e Foz do Iguaçu. Paranaguá apresenta coeficiente de incidência de 278,3 por 100.000 habitantes, superando Curitiba com 236,9 por 100.000 habitantes. A incidência dos casos de AIDS que para o ano de 1986 era de 0,9% casos para cada 100.000 habitantes, passou para 11,6 por 100.000 habitantes em 1996 (BRASIL,2000).

A doença começou entre homens homossexuais e bissexuais, em grandes metrópoles no Sudeste do Brasil e disseminou para outros grupos de risco como os usuários de drogas ilícitas e receptores de produtos de sangue. A doença alcançou rápido incremento entre 87-89 e 90-92, mas mostrou um *plateau*, particularmente no grupo homossexual e bissexual. A incidência entre heterossexuais e em pequenos municípios (<50.000 habitantes) tem continuado a aumentar indicando uma tendência da epidemia.

O primeiro caso de AIDS em mulheres foi diagnosticado em 1983. Hoje são 47.949 (25,11%) casos de AIDS do sexo feminino, e o seu aumento

caracteriza-se como uma das principais tendências atuais da epidemia no país, denominado de feminização da epidemia, acompanhado por um número cada maior de crianças atingidas. Em 1983, a razão de casos entre homens e mulheres que era de 17:1, passou para 2:1 em 1997. O grupo etário mais acometido pela AIDS é o de 20 a 44 anos, com 80,8% do total de casos. A incidência entre casos de transmissão heterossexual, que era de 4 em 1989 e 1990, passou para 24,7% em 2000, mostrando grande aumento nesta forma de transmissão. Os usuários de drogas injetáveis ilícitas também apresentam tendência de crescimento, com incidência de 5% em 1986, para 26% em 1991, porém com diminuição para 16% em 1997. A transmissão por sangue e hemoderivados mostra tendência decrescente, de 7,2% em 1989, para 1,1% em 2000 (BRASIL, 2000). Considerando-se o nível de escolaridade como um indicador da situação sócio-econômica os dados revelam um perfil de empobrecimento crescente, concomitante com a mudança do perfil de transmissão.

O documento divulgado pelo programa das Nações Unidas para HIV/AIDS (UNAIDS) em novembro de 1998 (LONDRES - Reino Unido), afirma que os níveis de infecção projetados em 1997 podem ter sido subestimados, havendo 3,4 milhões de pessoas no mundo inteiro com HIV, número 19% maior que o projetado um ano antes. Ainda de acordo com o mesmo, 11 homens, mulheres ou crianças foram infectados por minuto durante o ano de 1998, totalizando 5,8 milhões de pessoas. Dez por cento dessas novas infecções ocorreram em crianças menores de 1 anos de idade, a maioria delas através de transmissão vertical, sendo que 50 das novas infecções acometeram jovens de 1 a 2 anos de idade. Somente neste último ano, 2,5 milhões de mortes foram atribuídas à AIDS, totalizando 1,9 milhões de mortes desde o início da epidemia (UNAIDS).

Estudos epidemiológicos apontam para uma tendência à interiorização, pauperização, juvenilização e feminização da epidemia da AIDS no Brasil com o surgimento de casos de AIDS em municípios situados em regiões de fronteira ou em cidades consideradas corredores para o tráfico de drogas e o surgimento dos casos de AIDS em populações jovens do sexo feminino com nível sócio- econômico baixo. Uma das características recentes da epidemia tem sido o

aumento progressivo dos casos de AIDS em mulheres, cerca de 44.697 casos de AIDS em mulheres já foram notificados à CN-DST/AIDS (33,56% do total acumulado de casos), sendo que 83% desses casos foram notificados em 1993 a 3 de junho de 2000, atingindo uma taxa de 6,7 casos por 100.000 mulheres em 1996, e apresentando uma tendência de crescimento de 0,7 casos por 100.000 mulheres por ano entre 1993 e 1996, uma das consequências diretas dessa maior participação feminina é o progressivo aumento da transmissão vertical. A primeira ocorrência de transmissão perinatal, foi em 1985, daí até 3 de junho de 2000, foram notificados 5409 casos a partir dessa forma de transmissão.(BRASIL, 2000).

Curitiba apresentou um total acumulado de 3.578 casos de AIDS no período de 1980 a 2000, correspondendo a 1,9 % do total de 190.949 casos no Brasil, representando uma incidência de 236,9 por 100.000 habitantes (BRASIL, 2000).

Vale ressaltar a tendência de diminuição dos óbitos por AIDS no Brasil, coincidindo com a adoção da terapia medicamentosa com anti-retrovirais, sendo a AIDS a 4.<sup>a</sup> causa principal de óbito no grupo etário de 20 a 49 anos de idade, tanto em homens quanto em mulheres (BRASIL, 2000).

As projeções da OMS estimam que no início do século XXI, haverá um total acumulado de 40 milhões de pessoas infectadas, encontrando-se 90% delas nos países em desenvolvimento (QUINN, 1996).

#### **1.4. Candidíase oral e AIDS**

*Candida* é o patógeno fúngico mais comumente isolado em hospedeiro imunocomprometido. A associação de candidíase oral e AIDS é mencionada no primeiro relato de AIDS em 1981 por GOTTLIEB e desde então inúmeros estudos têm confirmado este achado. A candidíase oral é a infecção oportunista mais freqüente, podendo chegar a 90% dos casos no paciente com AIDS e indicativa de rápida progressão da doença (DATRY, 1992; KORTING, 1989; MEUNIER, 1989), porém restrita ao trato digestivo alto (DATRY, 1992; COLOMBO et alii, 1996).

A candidíase disseminada hematogenicamente ou invasiva é rara no HIV+ e quando isto ocorre pode estar relacionado com a presença de neutropenia e/ou cateteres intravenosos, ao contrário do que ocorre em outras formas de imunossupressão (transplantados, pós-quimioterapia, neoplasia, pós-antibioticoterapia) (MEUNIER, 1989).

A presença de candidíase orofaríngea ou esofágica é bom marcador de AIDS (LAROCHE et alii, 1988). Em 1984, KLEIN et alii sugeriram a importância prognóstica da candidíase oral nos pacientes HIV+. Infecção mucosa por *Candida* ocorre em um padrão hierárquico e usualmente progressivo na mulher HIV+ (IMAM et alii, 1990; DUPONT et alii, 1994). Candidíase vaginal pode ocorrer na paciente HIV+ com pouca ou nenhuma supressão dos linfócitos T CD4, em geral ao redor de 400 células/mm<sup>3</sup>, a candidíase orofaríngea aparece quando o linfócito T CD4 é cerca de 200 células/mm<sup>3</sup> e candidíase esofágica ocorre mais freqüentemente quando o linfócito T CD4 é menor do que 100 células/mm<sup>3</sup> (DATRY, 1992; DUPONT et alii, 1994). A infecção por *Candida* em paciente HIV+ parece ser decorrente de origem multifatorial, envolvendo alterações nos mecanismos inespecíficos e específicos de defesa do hospedeiro, bem como do agente infeccioso ou ambos.

ATKINSON et alii (1990) ao estudar 37 pacientes HIV positivos, assintomáticos e com AIDS, evidenciou que quatro conhecidas proteínas salivares de ação antibacteriana e antifúngica estavam elevadas nos pacientes com candidíase orofaríngea: lactoferrina, lisozima, IgA secretória e histatina. Se estas proteínas são elevadas por causa da infecção pelo HIV ou seqüela decorrente da infecção por *Candida* não pode ser determinada por este estudo. No entanto, níveis salivares de lisozima, lactoperoxidase, calprotectina e lactoferrina encontraram-se baixos nestes doentes em outro trabalho (MÜLLER et alii, 1993).

Xerostomia definida pelo paciente como boca seca e objetivamente pela evidência de mucosa oral seca com diminuição do volume de secreção salivar em paciente HIV+ foi descrito por DATRY, 1992, sugerindo lesão das glândulas salivares pelo vírus (DATRY, 1992) e pelo uso de drogas antiretrovirais (ATKINSON et alii, 1990). A xerostomia aumenta a susceptibilidade à candidíase

devido à baixa ação lubrificante da saliva, aumenta a possibilidade de lesões traumáticas da mucosa oral e existe uma redução dos constituintes salivares que participam da imunidade local, e acompanhada de baixo pH, favoreceria a atividade de proteinase de *C. albicans*.

OLLERT et alii, 1995, descreveu níveis aumentados da expressão e secreção de proteinase secretória de *Candida albicans* em isolados de pacientes HIV+, um fator de virulência de *C. albicans*, que muito provavelmente promove a aderência e a penetração das células hospedeiras. Este aumento independia do estadió clínico da doença e do nível de CD4, e provavelmente, a seleção de subpopulação de *C. albicans* fenotipicamente diferente ocorre precocemente, nestes pacientes.

COOGAN, SWEET, CHALLACOMBE, 1994, ao estudarem uma população de 124 homens, entre HIV+ assintomáticos, com AIDS e controles, observaram que a concentração, atividade e taxa de secreção, por minuto de IgA e subclasses IgA1 e IgA2 anti *C. albicans*, na saliva total e na secreção parotídea, eram maiores nos HIV+ assintomáticos e nos doentes do que no grupo controle. Este aumento na secreção de anticorpo pode ser relacionado ao estímulo antigênico, já que quase metade dos pacientes HIV+ e pacientes com AIDS portavam mais do que  $10^3$  UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias/mL) na saliva. Em HIV+ e em pacientes com AIDS parece haver resposta imune humoral adequada frente a infecções mucosas por *Candida*.

O progressivo declínio da imunidade mediada por célula devido função anormal de linfócitos T ou macrófagos, marco na progressão da infecção pelo HIV é relacionada com a ocorrência de candidíase (DATY, 1992; DUPONT et alii, 1992). A imunidade mediada por célula, consistindo de células T CD4+, CD8+, macrófagos e outros tipos celulares, que protegem o organismo contra invasores, produzem citocinas. Células T *helper* tipo 1 (TH1) secretam interferon gama ( $\text{INF-}\gamma$ ) e interleucina 2 (IL2) e contribuem para resposta mediada por célula, tais como ativação de macrófagos e hipersensibilidade retardada e é associada com proteção contra candidíase mucocutânea. Células T *helper* tipo 2 (TH2) produzem interleucina 4, 5, 10 e ajudam células B a gerar resposta de anticorpos. A inversão

da relação CD4+/CD8+ traduz-se pela disfunção na liberação de citocinas relacionadas com a resposta de tipo TH1, que conduz a alteração funcional de fagócitos mono e polimorfonucleares, levando ao prejuízo da fagocitose e destruição de leveduras (CHALLACOMBE, 1994; MISHRA et alii, 1994; SALK et alii, 1993; GREENSPAN & GREENSPAN, 1997).

Estudos têm sido conduzidos no sentido de documentar as características de virulência de *C. albicans* em pacientes com AIDS. DE BERNARDIS et alii, 1996, no seu estudo para avaliação do fator de virulência associado de *C. albicans* em pacientes HIV+ demonstrou que os mesmos apresentavam maior secreção de proteinase aspártica do que aqueles procedentes de indivíduos HIV- ou HIV+ assintomáticos. Esta capacidade diferencial foi mantida pelas cepas mesmo após anos de manutenção das células estocadas e, outrossim, os isolados altamente secretores de proteinase foram significativamente mais patogênico para camundongos do que aqueles que apresentavam baixa taxa de secreção. Não foi observada diferença genética entre isolados altamente secretores e pouco secretores de proteinase aspártica, sugerindo que durante a infecção pelo HIV, deveria haver seleção de cepas ou biotipos mais virulentos de *C. albicans*.

OLLERT et alii, 1995, detectou em seu trabalho que o aumento da atividade proteinase em isolados de *C. albicans* de paciente HIV+ foi independente do estadio clínico e o número de linfócito T CD4, nenhuma correlação da atividade da proteinase com o sorotipo de *C. albicans* foi encontrado embora o sorotipo B fosse significativamente mais freqüente no grupo HIV+; entretanto uma correlação positiva de atividade proteinase e susceptibilidade antifúngica, foi observada. Os isolados de indivíduos HIV+ que foram caracterizados por altos níveis de atividade proteinase foram também menos suscetíveis aos antifúngicos azólicos (cetoconazol e fluconazol), indicando que a resposta aos agentes antifúngicos pode ser modulada em associação com a doença HIV, também confirmados por WU et alii, 1996.

A aderência de *C. albicans* às células da superfície oral é essencial para iniciar o processo de colonização e infecção. Sendo necessário haver



interação entre peptídios presentes na superfície da célula fúngica e da célula epitelial (TOSH & DOUGLAS, 1992).

SWEET, COOKSON, CHALLACOMBE, 1995, em estudo para determinar se cepas de *C. albicans* isoladas de indivíduos HIV+ ou AIDS possuíam propriedades de aderência alterados em experimentos *in vitro*, observou que os isolados de *C. albicans* de 49 pacientes HIV+ ou AIDS aderiam às células epiteliais bucais em número significativamente maiores do que o grupo controle, sendo que não houve diferença na aderência entre cepas de pacientes HIV+, ou AIDS, ou entre portadores de *C. albicans* ou pacientes com candidíase oral, levando a sugerir que a infecção pelo HIV está associada à seleção de cepas de *C. albicans* que possuem maior habilidade em aderir à mucosa oral e precocemente, antes do surgimento dos sintomas de imunodeficiência. Estudos têm sido centrados na localização e aderência das proteínas e nas moléculas de manoproteínas na superfície externa da parede celular de *C. albicans*, o qual desempenha papel importante na adesão (FUKAZAWA & KAGAYA, 1997).

Candidíase oral é uma das infecções oportunistas mais freqüentes em pacientes com AIDS sendo *C. albicans* seu agente mais comum (KORTING, 1989). Outras espécies, intrinsecamente menos suscetíveis ao fluconazol, têm emergido como causadores de lesões orais, particularmente *C. krusei* e *C. (T.) glabrata* (MILLON et alii, 1994<sup>a</sup>; VANDEN BOSCHE et alii, 1994; TORRES-RODRIGUES, 1996; HITCHCOCK et alii, 1993).

Isolamento de culturas mistas em candidíase orofaríngea nos pacientes com AIDS tem sido descrito (DRONDA et alii, 1996; FOX et alii, 1991; NEWMAN et alii, 1994). CHROMagar® *Candida* é um novo meio de cultura diferencial que facilita o isolamento e identificação presuntiva de algumas espécies de leveduras clinicamente importantes. *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* são isolados e identificados presuntivamente de outras espécies na base da coloração de suas colônias fortemente pelas reações de enzimas espécies específica com um substrato cromogênico. A especificidade e sensibilidade do novo meio para a identificação presuntiva de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* excedeu 99% para todas as 3 espécies (ODDS &

BERNAERTS , 1994; BERNAL et alii, 1996; PFALLER et alii, 1996; ARENDRUP et alii, 1999).

MILLON et alii, 1994a, definem como candidíase oral quando o número de leveduras numa dada amostra coletada por *swab* apresenta mais do que 50 unidades formadoras de colônias (UFC) em placas de ágar Sabouraud. No entanto este critério é controverso e está em permanente debate, para CHAVE et alii, 1989, contudo quando existe sinais e sintomas orais a cultura das lesões mostrando 10 ou mais colônias de *Candida* sp. em ágar Sabouraud já são suficientes.

Para SAMONIS et alii, 1990, o diagnóstico de infecção fúngica (candidíase oral) é feito somente se o indivíduo possuía lesões sugestivas de candidíase oral (coletadas por *swab*), associadas à cultura positiva em ágar.

BORROMEO, McCULLOUGH, READE, 1992, ao avaliarem as técnicas de cultura de *imprint* e bochecho para isolamento de *C. albicans* em uma tentativa para determinar se existem diferenças quantitativas no número e distribuição anatômica de leveduras entre indivíduos sadios e pacientes portadores de candidíase eritematosa, detectou que a simples quantificação de *C. albicans* em um dado indivíduo não era indicativa de doença ou saúde.

BRAWNER & CUTLER, 1989, ao avaliarem os isolados de *C. albicans* de indivíduos hospitalizados ou não e pacientes imunocomprometidos com ou sem AIDS detectaram nos indivíduos imunocompetentes porcentagem similares de sorotipos A e B de *Candida albicans*. No entanto, nos imunocomprometidos a frequência do sorotipo B é duas vezes maior.

VELEGRAKI, 1995, em seu estudo para avaliação da susceptibilidade de *C. albicans* de paciente imunocomprometidos, estudou 30 pacientes com AIDS e observou que o sorotipo B era encontrado em 70% deles. As amostras pertencentes ao sorotipo B apresentavam CIM (concentração inibitória mínima) significativamente elevadas para fluconazol e itraconazol quando comparadas com as do sorotipo A. No estudo de AUGER et alii, 1979, foi observado que 666 cepas de *Candida albicans*, 74,3 % eram sorotipo A e 25,7% eram sorotipo B, e observou que a maioria das cepas do sorotipo A eram

sensíveis à 5-fluocitosina (5-FC), contudo metade (49,7%) das cepas do sorotipo B mostraram-se resistentes ao 5-FC (CIM>25µg/ml ao 5-FC).

Uma grande variedade de agentes está disponível para o tratamento de candidíase oral. Alguns destes antifúngicos são usados topicamente, outros são usados sistemicamente por via oral ou endovenosa.

Terapia tópica para candidíase orofaríngea com agentes antifúngicos tradicionais incluem clotrimazol ou suspensões orais de nistatina que são freqüentemente mal sucedidos por necessitarem de dose diária freqüente, tempo de contato insuficiente entre a droga e a mucosa oral, falta de saliva adequada, sabor desagradável, e presença de açúcares indutores de cáries e eficácia insuficiente entre outros. Até a recente introdução de novas formulações, soluções orais de itraconazol e fluconazol, a terapia antifúngica sistêmica oral e intravenosa é a escolha para as infecções mais extensas (BLATCHFORD, 1990; HAY, 1990; BODEY, 1992; ODDS, 1993; GREENSPAN, 1994; DAROUICHE, 1998). Anfotericina B e fluocitosina são raramente usados para o tratamento de candidíase orofaríngea ou esofágica e são geralmente reservados para o tratamento de infecções invasivas. Cetoconazol, o primeiro agente azólico oral introduzido comercialmente na década de 1980, trouxe contribuição valiosa para o armamentário antifúngico oral no tratamento de infecções por *Candida*, porém tem seu uso restrito devido à má absorção em paciente com acloridria, numerosas interações droga-droga, hepatotoxicidade e inibição da síntese de esteróides adrenais ou testosterona.

A introdução de agentes antifúngicos triazólicos: fluconazol em 1990 e itraconazol em 1992, marcou um importante avanço com respeito à eficácia e segurança. Fluconazol tem sido usado extensivamente para o tratamento de uma variedade de infecções fúngicas superficiais e sistêmicas em pacientes HIV+ (DAROUICHE, 1998).

Fluconazol é geralmente seguro e bem tolerado e produz resposta clínica e micológica rápida quando usada para o tratamento de candidíase orofaríngea e esofágica, entretanto certas espécies de *Candida* são intrinsecamente altamente resistentes (*C. krusei*) ou intermediariamente

resistentes (*C. glabrata*) ao fluconazol *in vitro* e existe uma evidência crescente de resistência à droga durante terapia com fluconazol em paciente HIV+.

## REFERÊNCIAS

Itraconazol é seguro e eficaz para o tratamento de uma variedade de infecções fúngicas superficiais cutâneas e sistêmicas profundas incluindo candidíase orofaríngea e esofágica. E, em particular, itraconazol mostrou um alto nível de atividade *in vitro* contra espécies de *Candida* fluconazol suscetíveis e muitas fluconazol resistentes. (BARCHIESI et alii, 1994<sup>a</sup>).

Até o presente, existe pouca evidência de padrões documentados de resistência *in vivo* ao itraconazol similar àqueles observados com cepas de *Candida* ao fluconazol.

Interações de drogas têm sido relatadas com os azóis, ou por causa da interferência com a absorção de azóis ou por causa de alterações das funções enzimas hepáticas. Uma lista parcial destas drogas incluem antiácidos, antagonistas receptores H<sub>2</sub>, sucralfate, fenitoína, rifampicina, ciclosporina, terfenadina, astemizol e warfarina (GREENSPAN, 1994).

A maioria dos estudos relacionados à suscetibilidade de leveduras de cavidade oral em doentes com AIDS, referem-se a séries de *Candida albicans* (GALLAGHER et alii, 1992; IMBERT-BERNARD et alii, 1994; ESPINEL-INGROFF, RODRIGUES-TUDELA, MARTÍNEZ-SUÁREZ, 1995; BARCHIESI et alii, 1996).

Com a introdução dos novos agentes antifúngicos notadamente, fluconazol, a emergência de cepas resistentes de *C. albicans* e outras espécies de *Candida* tornaram-se um problema no manejo de infecções por *Candida* (DAROUICHE, 1998). Foram encontrados alguns casos de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, isoladas em cavidade oral de pacientes com AIDS: KITCHEN, SAVAGE, HARRIS, 1991, um isolado resistente; DIZ DIOS et alii, 1993, dois isolados resistentes; BOKEN, SWINDELLS, RINALDI, 1993, quatro isolados resistentes; BART-DELABESSE et alii, 1993, quatro isolados resistentes; SANGUINETTI, CARMICHAEL, CAMPBELL, 1993, um isolado resistente; HEINIC et alii, 1993, dois isolados resistentes; NEWMAN et alii, 1994, oito isolados resistentes; REDDING et alii, 1994, um isolado resistente; RUHNKE et alii, 1994,

dois isolados resistentes; SANGEORZAN et alii, 1994, quatro isolados resistentes; LE GUENNEC et alii, 1995, três isolados resistentes; RODRÍGUEZ-TUDELA et alii, 1995, nove isolados resistentes; REVANKAR et alii, 1996, sete isolados resistentes; LAGUNA et alii, 1997, 25 isolados resistentes; MAENZA et alii, 1997, 26 isolados.

SANGEORZAN et alii, 1994, em seu estudo da epidemiologia e efeito do tratamento da candidíase oral em paciente HIV+ com fluconazol e clotrimazol, concluíram que muitas cepas diferentes de *C. albicans* colonizam e causam candidíase oral em pacientes HIV+; os pacientes são usualmente colonizados com uma única cepa e as recorrências seguindo o tratamento são usualmente devida à mesma cepa em 74% das vezes. A resistência ao fluconazol pode ocorrer através da aquisição de uma nova cepa resistente ou a emergência de resistência de *C. albicans* previamente suscetível.

Uso prolongado de fluconazol em esquemas terapêuticos ou profiláticos é um fator na seleção de isolados resistentes e colonização por outras espécies (JUST-NÜBLING et alii, 1990; COLOMBO et alii, 1995; DUPONT et alii, 1994; REX, RINALDI, PFALLER, 1995<sup>b</sup>).

O primeiro relato de resistência aos azóis em doentes com AIDS foi relacionado ao cetoconazol (TAVITIAN et alii, 1986); felizmente, contudo, pouco são os relatos de resistência ao cetoconazol e itraconazol (ST.-GERMAIN et alii, 1995; BARCHIESI et alii, 1994<sup>a</sup>; FAN-HAVARD et alii, 1991) e extremamente incomum à anfotericina B (FAN-HAVARD et alii, 1991), porém pequenas modificações do método de referência NCCLS, ou o uso de tecnologia baseada em ágar pode permitir a detecção de resistência clinicamente importante à anfotericina B, não detectada pelos métodos atuais (PFALLER, 2000).

LANDMAN, SAURINA & QUALE, 1998, descreveram um paciente com AIDS e candidíase oral resistente aos azólicos, que também se tornou refratária a anfotericina B e 5-FC, porém isto é muito raro.

Dada a sua larga utilização desde a sua introdução no mercado, vários são os relatos na literatura sobre resistência ao fluconazol. A incidência e prevalência de resistência ao fluconazol tem variado de 5 a 56%. (KORTING et

alii, 1989; HEINIC et alii, 1993; PFALLER et alii, 1994; QUEREDA et alii, 1996; BARCHIESI et alii, 1996; MAENZA et alii, 1997; LAGUNA et alii, 1997). A vasta maioria de falhas ao tratamento com fluconazol tem ocorrido em pacientes HIV+ com imunossupressão avançada, marcada pelo nível de CD4+ baixo (FOX et alii, 1991; KITCHEN, SAVAGE, HARRIS, 1991; WILLOCKS et alii, 1991; BOKEN, SWINDELLS, RINALDI, 1993; BAILY et alii, 1994; NEWMAN et alii, 1994; RUHNKE et alii, 1994; MAENZA et alii, 1996; REVANKAR et alii, 1996; LAGUNA et alii, 1997).

Pacientes que desenvolveram resistência ao fluconazol tinham mais episódios prévios tratados do que os controles e maior duração média de toda terapia antifúngica e de terapia azólica sistêmica (MAENZA et alii, 1996).

A dose cumulativa média de 10,6 gramas de fluconazol administrado, intermitentemente, foi também fator correlacionado com resistência (VUFFRAY et alii, 1994). MILLON et alii, 1994<sup>a</sup>, demonstraram que dose cumulativa maior que 10g administrada continuamente, durante mais de 3 meses, estava relacionada à resistência. No estudo de SANGIARD et alii, 1995, altas doses cumulativas de fluconazol variando de 12,6g a 71,2g foram observadas nos pacientes que apresentaram leveduras menos suscetíveis aos azólicos. Até então concluía-se que a dose cumulativa obtida, tanto por administração intermitente quanto prolongada, funciona como importante fator de risco para o desenvolvimento de resistência ao fluconazol.

Recentemente, REVANKAR et alii, 1998<sup>a</sup>, na avaliação dos efeitos da terapia intermitente ou contínua com fluconazol na recorrência e desenvolvimento de resistência ao fluconazol detectou que em pacientes com recorrências frequentes, terapia supressiva contínua reduziu significativamente as recidivas e a colonização. A resistência ocorreu com ambas terapias, intermitente e contínua, porém com resposta terapêutica excelente a altas doses de fluconazol.

HEALD et alii, 1996, referem que a exposição ao fluconazol através de tratamento contínuo e intermitente é associado com o estado de colonização ou portador de leveduras resistentes, sugerindo que o tratamento contínuo com fluconazol pode proteger contra o desenvolvimento de candidíase luminal

recorrente em alguns pacientes por persistente esterilização da cavidade oral em mais de 75% dos pacientes; o uso intermitente de fluconazol foi mais freqüentemente associado com a emergência de *C. albicans* resistente e espécies não-*albicans*. O uso freqüente de fluconazol é também associado com a emergência de outras espécies de *Candida*, tais como *C. (T.) glabrata* e *C. krusei* que são intrinsecamente resistente a este antifúngico (BART- DELABESSE et alii, 1993; BARCHIESI et alii, 1994<sup>a</sup>; DUPONT et alii, 1994; MILLON et alii, 1994<sup>a</sup>; PFALLER et alii, 1994; REDDING et alii, 1994; REVANKAR et alii, 1996; DUPONT, DROMER e IMPROVISI, 1996).

Foram descritas várias espécies de leveduras não-*albicans*, resistentes ao fluconazol, isoladas em cavidade oral de pacientes com AIDS: FOX et alii, 1991, uma *C. (T.) glabrata*, POWDERLY, ROBINSON & KEATH, 1993, uma *C. (T.) glabrata*; TROILLET et alii, 1993, uma *C. (T.) glabrata*; MILLON, REBOUX, BARALE, 1994<sup>b</sup>, uma *C. (T.) glabrata* e cinco *C. krusei*; NEWMAN et alii, 1994, três *C. (T.) glabrata*; CHAVANET et alii, 1994, cinco *C. (T.) glabrata*, uma *C. tropicalis* e três *C. krusei*; DELLION et alii, 1995, duas *C. (T.) glabrata* e uma *C. krusei*; QUEREDA et alii, 1996, quatro *C. (T.) glabrata* e duas *C. inconspicua*.

MILLON, REBOUX e BARALE, 1994<sup>b</sup>, relataram o surgimento de *C. (T.) glabrata* e *C. krusei* em seis pacientes, num estudo de seguimento de 30 pacientes com AIDS, em que 21 apresentaram candidíase orofaríngea por *C. albicans* e que foram tratados com fluconazol, e que apresentavam CIM maior do que 64 µg/ml.

A presença de isolados não-*albicans* em relatos de resistência varia, e as CIM destes organismos tendem a ser altos. As amostras de *C. não-albicans* não são isoladas inicialmente, mas mais freqüentemente são adquiridas após cursos de tratamento. A presença de isolados de *C. não-albicans* é algumas vezes, mas nem sempre, associada com falha com tratamento (REX et alii, 1995<sup>b</sup>).

A ocorrência de resistência a outros azólicos (cetoconazol e itraconazol) foi relatada por SAINT-GERMAIN et alii, 1995. BARCHIESI et alii, 1994<sup>a</sup>, ao analisarem a atividade do itraconazol contra isolados de *C. albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol, detectaram que os isolados com CIM

elevadas para fluconazol, também possuíam CIM proporcionalmente altas para itraconazol, porém felizmente, o potencial para resistência cruzada entre estes azóis parece ser baixa.

Em várias publicações, a resistência foi descrita em *C. krusei* e *C. (T.) glabrata* tão bem com *C. albicans*. Embora estas cepas de *C. não-albicans* fossem colonizadoras em casos de falha de tratamento, elas são raramente associadas com candidíase sintomática (POWDERLY, ROBINSON, KEATH, 1993; SANGEORZAN et alii, 1994; BAILLY et alii, 1994; REVANKAR et alii, 1996).

GRAYBILL et alii, 1998, avaliaram em um estudo prospectivo multicêntrico randomizado 179 pacientes HIV+, três regimes de tratamento: itraconazol solução oral, 200mg/dia por 7 dias; itraconazol 200mg/dia por 14 dias; e fluconazol 100mg/dia por 14 dias. Estes estudos foram associados com resposta clínica de 83%, 97% e 87%, respectivamente, e cura micológica de 52%; 88% e 77%, respectivamente. Metade dos pacientes em todos os 3 grupos recidivaram um mês após completar o tratamento. Itraconazol é bem tolerado e oferece uma alternativa tão eficaz quanto o fluconazol no tratamento de candidíase orofaríngea.

LAGUNA et alii (1997) avaliaram 119 episódios de candidíase oral devido a *Candida albicans* para estudar os padrões de suscetibilidade ao fluconazol e as características dos pacientes e confirmar a correlação de suscetibilidade dos isolados ao fluconazol e terapêutica. Encontraram 61 isolados suscetíveis ( $MIC \leq 0,5$ ), 33 isolados intermediários ( $MIC$  1-8) e 25 isolados resistentes ( $MIC \geq 16$ ). Entre as cepas resistentes encontrou as seguintes características: CD4 baixo (média 12/mm<sup>3</sup>), diagnóstico de AIDS menos recente, tratamento prévio e profilaxia com fluconazol mais freqüentemente, suscetibilidade diminuída ao cetoconazol e itraconazol nas cepas resistentes e intermediárias; fluconazol foi ineficaz para pacientes infectados com isolados resistentes; doses aumentadas de cetoconazol e itraconazol foram eficazes em 81% dos casos.

PALELLA et alii, 1998, relatam que o uso rotineiro de terapia antiretroviral (HAART) com regimes combinados que incluem inibidores de protease às drogas antiretrovirais foram mais benéficos do que monoterapia e regimes combinados sem inibidores de protease com declínio dramático na



morbidade e mortalidade entre paciente HIV+ com avançada imunossupressão, verificados também por VITTINGHOFF, 1999.

DIZ DIOS et alii, 1999, ao acompanhar 75 pacientes HIV+ em uso de inibidor de protease, encontrou pelo menos um episódio de candidíase orofaríngea em 56% dos pacientes em uso apenas de inibidores de transcriptase reversa e somente 9,3% dos pacientes após início de terapia com inibidores de protease, confirmados por trabalho de CAUDA et alii, 1999. A instituição de terapia antiretroviral (HAART), com supressão da replicação do HIV, é provavelmente o método mais importante na prevenção de candidíase refratária, devendo seu mecanismo de ação ser estudado.

## 2. OBJETIVOS

A presente investigação foi realizada com os seguintes objetivos:

1. Verificar a eficácia de 2 métodos de coleta na obtenção de material de orofaringe (*swab* e bochecho) de pacientes com AIDS e candidíase oral pseudomembranosa.
2. Analisar a positividade de 2 meios de cultura (Sabouraud e CHROMagar® *Candida*) para o isolamento de leveduras de candidíase oral.
3. Avaliar a extensão do acometimento de mucosa em candidíase oral, comparando pacientes com diferentes condições dentárias e CD4.
4. Avaliar as espécies relacionadas ao quadro de candidíase.
5. Avaliar a presença de co-infecção através de CHROMagar® *Candida*).
6. Analisar o perfil de suscetibilidade destas cepas a quatro antifúngicos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Procedência dos pacientes**

Os pacientes envolvidos no presente estudo foram selecionados entre casos atendidos nos serviços de Infectologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC–UFPR) e Hospital Oswaldo Cruz do Instituto de Saúde do Paraná (HOC–ISEPR), durante o período de fevereiro de 97 a junho de 98. A seleção, preenchimento de ficha clínico-epidemiológica e procedimentos de coleta foram realizados exclusivamente pelo investigador principal. O HC-UFPR é um hospital público, terciário, de grande porte, com 600 leitos que atende cerca de 1900 casos de pacientes portadores de HIV-AIDS ao ano. O HOC-ISEPR é um hospital público, de nível secundário, que oferece 20 leitos para pacientes portadores de HIV-AIDS.

#### **3.2. Critérios de inclusão e exclusão**

Durante o período de estudo foram avaliados todos os pacientes seqüencialmente atendidos em ambos os serviços mencionados e que apresentaram diagnóstico de AIDS, categoria clínica C (CDC,1993), com confirmação laboratorial da infecção por pesquisa de anticorpos específicos anti-HIV por técnica de ELISA. Foram incluídos no estudo indivíduos maiores de 18 anos com presença de candidíase oral pseudomembranosa. A definição de candidíase oral pseudomembranosa foi baseada na presença de pseudomembrana esbranquiçada e removível em mucosa oral com confirmação laboratorial da presença de *Candida* sp. na lesão. Foram excluídos os pacientes

que fizeram uso de antifúngicos tópicos na última semana e antifúngicos sistêmicos nas últimas duas semanas, bem como aqueles que, apesar de apresentar exame clínico sugestivo de candidíase oral, tiveram resultados negativos da cultura e exame direto da lesão.

### **3.3. Ficha epidemiológica e exame clínico**

Os dados clínicos e epidemiológicos foram registrados segundo ficha de estudo apresentada em anexo 1. Foram avaliadas as seguintes variáveis : dados demográficos, estadiamento da AIDS (contagem de linfócitos T CD4, infecção oportunista prévia e concomitante) candidíase prévia e tratamento antifúngico anterior. Após o preenchimento da ficha clínico-epidemiológica todos os pacientes foram submetidos a exame da cavidade oral com auxílio de espátulas e foco de luz adequados para caracterização de condições gerais de arcada dentária, presença de tumores ou ulcerações não relacionadas à definição de caso e avaliação da extensão de envolvimento pela candidíase oral.

Caracterização da extensão da candidíase de mucosa

Os casos de candidíase oral foram classificados em três graus de gravidade de acordo com os seguintes critérios:

Leve: pseudomembrana em área restrita e única

Moderada: comprometimento de mais de um local e língua

Grave: comprometimento extenso da mucosa oral em toda ou quase toda a cavidade

### 3.4. Coleta e processamento das amostras

Os pacientes admitidos no estudo foram submetidos a duas coletas seqüenciais de material da cavidade oral, cada qual envolvendo diferente metodologias.

#### A. Método do bochecho

Após higiene bucal através de um bochecho simples com água, era realizado o bochecho com água destilada por pelo menos 20 segundos sendo o fluido expelido e acondicionado em frasco de boca larga esterilizado e transportado até o laboratório de micologia, em até 4 horas. O material coletado por bochecho era transferido para tubo esterilizado e submetido a centrifugação a 3000rpm por cinco segundos. Retirado o sobrenadante, o sedimento era ressuspenso em 1ml do próprio sobrenadante e, após homogeneização, o material era semeado em placa de Petri contendo meios adequados para culturas de leveduras.

#### B. Método do *swab*

O *swab* umedecido em água esterilizada era friccionado sobre toda a superfície da cavidade oral (mucosa gengival, palato mole, mucosa jugal, assoalho da boca, língua). Posteriormente era introduzido em tubo contendo água destilada esterilizada e transportado até o laboratório de micologia, em até 4 horas. No laboratório, o material do *swab* era semeado em placas de Petri contendo meios adequados para culturas de leveduras. A coleta e processamento das amostras foram realizados segundo rotina resumida em anexo II.

### **3.5 Documentação microbiológica**

#### **3.5.1. Exame direto**

Cada alíquota de material coletado por *swab* foi submetida a exame micológico direto com coloração de Gram e exame direto a fresco com KOH no sedimento resuspenso do bochecho. A presença de leveduras e pseudo-hifas era considerada sugestiva de presença de *Candida* sp. após crescimento em cultura.

#### **3.5.2.Culturas**

##### **3.5.2.1. Semeadura**

O material obtido por *swab* foi semeado nas superfícies de dois meios de cultivo sólidos contidos em placas de Petri (9 x 13) sendo posteriormente distribuído com auxílio de alça de platina por técnica de esgotamento e incubados a 30°C pelo período de 5 a 7 dias. Do material obtido por bochecho, uma gota do sedimento foi semeada em cada superfície de dois meios de cultivos sólidos contidos em placas de Petri (9 x 13) e distribuídas com auxílio de alça de platina por técnica de esgotamento, sendo incubados a 30 graus por período de 5 a 7 dias.

##### **3.5.2.2 Meios utilizados**

Foram utilizados os seguintes meios:

ÁGAR-SABOURAUD dextrose – meio clássico de uso rotineiro em laboratório de micologia e cuja composição e técnica de preparo foram resumidas no Anexo III, ao qual foi adicionado cloranfenicol.

CHROMagar® *Candida* – este meio foi incluído na tentativa de identificar co-infecção por mais de uma espécie de *Candida* visto que diferentes espécies apresentam diversidade cromogênica no referido meio. Trata-se de meio seletivo,

cromogênico, para crescimento e identificação presuntiva de espécies de *Candida*, através da formação de colônias com pigmentação diferenciada: *Candida albicans* (colônia verde), *Candida tropicalis* (colônia azul cinza), *Candida kruzei* (colônia rosa felpudo), outras espécies (colônia branca para rosa). A composição e sua técnica de preparo foram resumidas no Anexo IV .

Nas culturas realizadas em CHROMagar® *Candida* sempre que houvesse crescimento de colônias com diferentes cores, foi determinada a necessidade de recultivo de cada uma destas colônias para posterior identificação e análise de suscetibilidade a antifúngicos.

#### **3.5.2.3. Processamento do material para identificação de leveduras e análise do perfil de suscetibilidade a antifúngicos**

O material foi processado no Laboratório Especial de Micologia (LEMI), vinculado às Disciplinas de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIPA) e de Biologia Celular, da Universidade Federal de São Paulo (Escola Paulista de Medicina). As colônias com características morfológicas de levedura foram repicadas para dois tubos, contendo respectivamente água destilada esterilizada e ágar Sabouraud-dextrose, para posterior identificação e realização dos testes de suscetibilidade. As colônias foram mantidas em ágar a 25°C e em ágar a 4°C.

#### **3.6. Isolamento**

As amostras foram encaminhadas ao laboratório, imediatamente após a sua coleta, sendo processadas, aproximadamente, dentro de duas horas. O material foi semeado com zaragatoa e distribuído na superfície do meio com alça de

nicromo, pela técnica de esgotamento, em placas de Petri descartáveis, contendo ágar Sabouraud-dextrose (DIFCO Laboratories Detroit, MI), adicionado de 300 µg/ml de cloranfenicol (Park-Davis), incubadas a 37°C, durante sete dias. As colônias com características morfológicas de levedura, foram repicadas para dois tubos contendo, respectivamente, água destilada esterilizada e ágar Sabouraud-dextrose, para posterior identificação e realização dos testes de suscetibilidade. As colônias foram mantidas em água a 25°C e em ágar a 4°C.

### **3.7. Identificação**

A identificação foi realizada de acordo com provas tradicionais, que compreendem análise de micromorfologia e perfis bioquímico e fisiológico, segundo VAN DER WALT (1971<sup>a</sup>).

#### **3.7.1. Prova do tubo germinativo**

Cultivos de 24-48 horas foram semeados em tubos contendo 0,5ml de soro humano e incubados a 37°C, durante duas a três horas. Uma gota de suspensão era pipetada em lâmina, coberta com lamínula e examinada ao microscópio óptico, com objetivas de 10x e 40x para observação do tubo germinativo.

#### **3.7.2. Prova do clamodoconídio ou microcultivo**

Realizada para confirmação do diagnóstico de *C. albicans* e para o estudo micromorfológico das demais leveduras. A levedura era semeada em três estrias sobre placa de Petri contendo ágar-fubá com Tween-80. As estrias feitas sobre o ágar eram cobertas com lamínula esterilizada e a placa incubada a 25-

28°C, durante 48 a 96 horas. As leituras, no microscópio óptico, eram realizadas diariamente, com objetivas de 10x e 40x, sendo analisadas quanto à presença de blastoconídios, artroconídios, hifas, pseudohifas e disposição das estruturas. A produção de clamidoconídios foi confirmatória para *C. albicans*.

### **3.7.3. Prova de assimilação de hidratos de carbonos e fontes de nitrogênio (auxanograma)**

O perfil bioquímico das leveduras, não-albicans, foi estudado quanto a sua capacidade de assimilação de carbono e nitrogênio. As fontes de carbono utilizadas foram: dextrose, maltose, sacarose, galactose, lactose, trealose, melibiose, L-arabinose, celobiose, xilose, rafinose, dulcitol, ramnose, inulina e inositol. Peptona e nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) foram empregados como fontes de nitrogênio. Era preparada suspensão da levedura em água destilada esterilizada, ajustando a turbidez de acordo com o padrão 5 da escala de MacFarland. Os meios C e N eram fundidos e estabilizados em banho-maria a 50°C. Para verificar a assimilação de fontes de carbono eram adicionados 2ml da suspensão a 40ml do meio C e vertidos em placa de Petri de 150x15mm. Para observar a assimilação de fontes de nitrogênio era adicionado 1 ml da suspensão a 20ml do meio N, sendo vertidos em placa de Petri de 90x15mm. Após a solidificação dos meios, as fontes de carbono (meio C) ou de nitrogênio (meio N) eram distribuídas equidistantemente sobre o ágar. As placas eram incubadas a 25-28°C, durante 24-96 horas. A leitura era realizada diariamente, sendo a positividade observada através do surgimento de halo de crescimento, na área correspondente a cada fonte.



#### **3.7.4. Prova de fermentação de açúcares (zimograma)**

Os açúcares utilizados foram: dextrose, maltose, sacarose, galactose, lactose e trealose. Da suspensão de cada levedura não albicans, em água destilada esterilizada, com turbidez compatível com o padrão 5 da escala de MacFarland, eram inoculados 200 $\mu$ L em tubos de ensaio contendo, cada um deles, meio de fermentação, tubo de Durham e o respectivo carboidrato a ser estudado. Os tubos eram incubados a 25-28°C, por 28 dias, sendo a leitura realizada diariamente, observando-se a produção gás (formação de bolha no interior do tubo de Durham).

#### **3.7.5. Pesquisa de ascosporos**

As leveduras com morfologia sugestiva de ascomiceto foram semeadas em meio V 8 e incubadas a 25-28°C. Após 20 dias, esfregaço em lâmina, corado pela técnica de Ziehl-Nielsen, era observado ao microscópio óptico, com objetiva de 100x. Foram levados em consideração tamanho e forma dos ascos e dos ascosporos, além do número de ascosporos em cada asco.

#### **3.7.6. Análise dos dados de identificação**

Os resultados das provas de identificação foram analisados pelo programa *Computer-Assisted Identification of Microorganisms* da *American Society for Microbiology* (1989) e pelas chaves de identificação de LODDER (1971); VAN DER WALT (1971b); VAN UDEN & BUCKLEY (1971); VAN UDEN & VIDAL - LEIRIA (1971).

### 3.7.7. Testes de suscetibilidade

Os microrganismos foram testados pelo método da microdiluição em caldo, realizado de acordo com a padronização publicada no documento M27-T pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS,1995). Leituras dúbias ou ensaios com elevados valores de CIM para os antifúngicos (fluconazol > 16 $\mu$ g/ml, itraconazol > 0,25 $\mu$ g/ml e cetoconazol > 0,25 $\mu$ g/ml) foram confirmados pela prova de macrodiluição em tubo (NCCLS,1992). Além dos isolado clínicos, foi incluído em cada dia de ensaio, um organismo-controle, *C. parapsilosis* ATCC 22019, do qual eram previamente conhecidas as CIM para cetoconazol, itraconazol, fluconazol e anfotericina B ( REX et alii,1996; 1997; WANGER et alii, 1995).

#### 3.7.7.1. Antifúngicos

Os quatro antifúngicos utilizados, anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e itraconazol, foram fornecidos sob a forma de pó, pelas respectivas indústrias farmacêuticas. A solução-estoque de cetoconazol (Janssen Pharmaceutica, Titusville, N.J.) foi preparada diluindo-se o pó em ácido clorídrico 0,2N para obter-se concentração de 10.000 $\mu$ g/ml. Itraconazol (Janssen Pharmaceutica) foi dissolvido em polietilenoglicol-400 aquecido (PEG, Union Carbide Danbury, C.T.), fluconazol (Pfizer Inc., New York, N.Y) em água destilada e anfotericina B (Bristol-Myers Squibb) em DMSO (dimetilsulfóxido). A solução-estoque dos três últimos antifúngicos citados apresentava concentração de 5.000 $\mu$ g/ml. As soluções-estoque de itraconazol e fluconazol foram mantidas à

temperatura ambiente por não mais que seis meses e de cetoconazol e anfotericina B, a -70°C, pelo período máximo de três meses.

#### **3.7.7.2. Meio de cultivo**

O meio líquido RPMI-1640 com L-glutamina, 2,0g/l de glicose, sem bicabornato de sódio e tamponado com MOPS a pH 7,0 (American Biorganic, Niagara Falls, N.Y.) foi usado nas técnicas de microdiluição e macrodiluição. O RPMI -1640, adquirido comercialmente sob a forma de pó, foi preparado em água deionizada, esterilizada, na concentração de 46,5g/l. O meio foi esterilizado por filtração, em filtro biológico (Nalgene Company, Rochester, N.Y.), conservado em refrigerador a 4°C e utilizado até três semanas após seu preparo. Durante todo o experimento, um único lote de RPMI-1640 foi utilizado. Em cada novo ensaio, alíquotas de 2ml do meio líquido foram incubadas nas mesmas condições do teste, para controle de esterilidade.

#### **3.7.7.3. Preparo do inóculo**

As leveduras foram mantidas à temperatura ambiente, em ágar Sabouraud-dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI), com três repiques prévios à realização do teste, sendo o último realizado 24-48 horas antes do experimento. Para o preparo do inóculo, as amostras foram cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose e incubadas a 35°C por 24-48 horas. A suspensão inicial do inóculo foi preparada em água deionizada, esterilizada e a transmitância foi ajustada para 90% em comprimento de onda de 530nm no espectrofotômetro, para obter, ao final do experimento, inóculo de 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  UFC/ml. O tamanho, a viabilidade e a pureza do inóculo foram controlados por cultivo de alíquotas da suspensão em placas de ágar Sabouraud-dextrose.

#### **3.7.7.4. Diluição em caldo realizada em placa de microtitulação (microdiluição)**

A microdiluição foi feita em placas plásticas esterilizadas (Nunc, Delta, Nunc, InterMed, Denmark) com fundo chato, contendo oito séries identificadas de A a H, cada qual com 12 poços (total -96 poços). A partir da solução-estoque de cada droga, eram preparadas soluções com dez vezes a concentração final desejada, a saber: fluconazol, 1,25-640  $\mu\text{g/ml}$ , itraconazol, 0,078 - 40  $\mu\text{g/mL}$ , cetoconazol, 0,15 - 80  $\mu\text{g/mL}$  e anfotericina B, 0,3 -160  $\mu\text{g/mL}$ . A seguir, estas drogas eram diluídas a 1:5 em RPMI-1640. Aliquotas de 100  $\mu\text{L}$  de cada concentração eram dispensadas em seqüência nas placas de microtitulação, com auxílio de pipeta multicanal (Digital Multichannel Pipette, Labsystems, Helsinki, Finland), de forma a permitir que os poços identificados de um a dez tivessem as dez diferentes concentrações. As placas eram estocadas a -20° C por período não maior que 30 dias.

No dia do experimento, as placas eram retiradas do congelador e mantidas por 30 minutos, a 25°C. A solução inicial de inóculo foi preparada conforme procedimento descrito, anteriormente. Tendo em vista a obtenção de solução balanceada de inóculo-meio, a preparação original de cada organismo foi diluída a 1:50 em água deionizada esterilizada e, em seguida, a 1:2 em RPMI-1640. Esta preparação de solução-trabalho do inóculo foi realizada para obtenção do dobro da concentração final desejada, visto que esta seria posteriormente adicionada a igual volume de solução contendo droga antifúngica.

Aliquotas de 10 $\mu$ l da solução final obtida em RPMI-1640 referente a cada inóculo, eram cultivadas em placa de ágar Sabouraud-dextrose para controle de viabilidade, pureza e tamanho do inóculo. A seguir, volumes de 100 $\mu$ l da solução de inóculo-RPMI-1640 eram dispensados nos orifícios da placa de microdiluição contendo 100 $\mu$ l de duas vezes as concentrações finais dos antifúngicos testados.

Os poços pertencentes à coluna identificada com o número 11 em cada placa de microdiluição foram utilizados como controle positivo, neles sendo dispensados apenas diluente do antifúngico e solução meio-inóculo. O poço número 12 foi o controle negativo, contendo apenas o meio RPMI-1640 (controle de esterilidade). As placas eram mantidas em estufas a 35°C por 48 horas.

No momento da leitura, o crescimento de microrganismos no poço-controle positivo (poço de número 11) foi comparado visualmente ao crescimento verificado nos poços referentes a diferentes concentrações testadas (poços de números 1 a 10). Para a leitura do teste, as placas eram colocadas em suporte contendo espelho, permitindo a observação clara do reverso das mesmas. A menor concentração capaz de induzir proeminente inibição (em torno de 50%) do crescimento verificado no microrganismo testado, em relação ao poço-controle, foi identificada como a CIM da droga para este microrganismo (NCCLS, 1995).

#### **3.7.7.5. Análise dos resultados**

A distribuição dos valores de CIM para os antifúngicos foi analisada de três formas: 1º) Variação dos valores, representando os limites inferior e superior das CIM de cada droga, referentes às diferentes espécies de fungos

testados; 2º) CIM<sub>50</sub>, definida como a concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas; 3º) CIM<sub>90</sub>, definida como a concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas.

Os critérios para definição de resistência ao fluconazol e itraconazol (tabela 1) foram aqueles sugeridos pelo NCCLS (REX et alii,1997). Em relação ao cetoconazol e anfotericina B, devido à falta de consenso na literatura, estabelecemos valores arbitrários para suas análises, já utilizados por outros autores (DEWSNUP & STEVENS,1994; MAENZA et alii,1996; REX et alii, 1995 a; RODRÍGUEZ-TUDELA et alii,1995; ST-GERMAIN et alii, 1995).

**TABELA 1 - Critérios de suscetibilidade a fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B**

	Fluconazol	Itraconazol	Cetoconazol	Anfotericina B
Sensível	$\leq 8\mu\text{g/ml}$	$\leq 0,125\mu\text{g/ml}$	$\leq 0,125\mu\text{g/ml}$	$\leq 1\mu\text{g/ml}$
DDS	16- 32 $\mu\text{g/ml}$	0,25 - 0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,25 -0,5 $\mu\text{g/ml}$	—
Resistente	$\geq 64\mu\text{g/ml}$	$\geq 1\mu\text{g/ml}$	$\geq 1\mu\text{g/ml}$	$\geq 2\mu\text{g/ml}$

DDS= dose dependente da suscetibilidade. Traduz a necessidade de elevada dose terapêutica para resposta clínica favorável ( BARRY & BROWN,1996).

Para verificação de resistência cruzada das leveduras em relação aos compostos azólicos, foi realizada análise de distribuição das CIM dos isolados segundo diferentes níveis de suscetibilidade, comparando-se valores sensíveis com DDS/ resistentes para os três antimicóticos.

### **3.8. Análise estatística**

Para a análise dos resultados, foram utilizados testes paramétricos e os não paramétricos, considerando-se a natureza das variáveis estudadas. Quando possível, empregaram-se mais de um teste, para uma mesma análise, com o objetivo de avaliar o fenômeno sob variados aspectos, descritos a seguir.

O teste do qui-quadrado com correção de Yates, foi utilizado para tabelas de contingência, com o objetivo de estudar a relação de dependência entre duas ou mais variáveis.

O teste de Mann-Whitney foi aplicado com o objetivo de comparar duas amostras em relação à soma total dos postos de cada uma, de amostras independentes obtidas pelos softwares “ *Primer of Bioestatistics* ” e “ *Epi- Info* ”.

A análise de variância – ANOVA - foi aplicada com o propósito de comparar duas ou mais amostras independentes, analisando a distribuição completa das curvas.

O nível de significância (ou probabilidade de significância) mínimo adotado foi de 5%.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Características dos pacientes estudados**

Durante o período de inclusão, foram estudados 59 pacientes com AIDS e coletadas 60 amostras sendo as amostras 20 e 44 provenientes do mesmo paciente.

**TABELA 2 – Características demográficas e laboratoriais de 59 pacientes com AIDS e candidíase oral**

DADOS	NÚMERO (n = 59)	PERCENTUAL (%)
SEXO		
• Masculino	44	(74,6)
• Feminino	15	(25,4)
COR		
• Branca	56	(94,9)
• Parda	01	(1,7)
• Mulata	02	(3,4)
IDADE		
• Média $\pm$ desvio padrão	33,7 $\pm$ 7,1	
• Mínimo e máximo	22,0 e 49,0	
ESCOLARIDADE	35	(59,3)
• 1º Grau	22	(62,9)
• 2º Grau	09	(25,7)
• 3º Grau	04	(11,4)
PROCEDÊNCIA	53	(89,8)
• Capital (Curitiba)	27	(50,9)
• Região Metropolitana	17	(32,1)
• Outro Município	05	(9,4)
• Outro Estado	04	(7,6)
LINFÓCITOS T CD4 (células/mm <sup>3</sup> ) <sup>(1)</sup>	57	(95,0)
• Até 50	36	(61,0)
• Acima de 50	21	(35,6)
• Não Determinado	03	(5,1)
• Média $\pm$ desvio padrão	52,2 $\pm$ 50,6	
• Mínimo e máximo	0,0 e 199,0	
• Mediana	33,0	

(1) Um paciente com duas contagens de linfócitos T CD4, sendo uma de 27 e outra de 119. Percentual calculado em razão do número de amostras realizadas (60).

Conforme ilustra a Tabela 2, os pacientes tinham idade média de 33,9  $\pm$  7,3 anos, variando de 22,0 a 49,0 anos, sendo 44 (74,6%) do sexo masculino e 15 (25,4%) do feminino.

A contagem de linfócitos T CD4 positivo variou de 0 a 199 células/mm<sup>3</sup> e mediana de 33,0. Em 36 pacientes (61,0%) a contagem de linfócitos T CD4 positivo era menor ou igual a 50 células/mm<sup>3</sup> caracterizando pacientes com imunossupressão grave. Em três deles (5,1%) não foi possível



determinar a contagem.

#### 4.1.1. Comportamento de risco

A distribuição de casos de AIDS entre indivíduos do sexo feminino e masculino segundo o tipo de exposição consta na Tabela 3.

**TABELA 3 - Tipo de exposição à AIDS segundo o sexo**

EXPOSIÇÃO	MASCULINO		FEMININO		TOTAL	
	N.º	(%)	N.º	(%)	N.º	(%)
SEXUAL	21	(47,7)	13	(86,7)	34	(57,6)
• Homossexual	10	(22,7)	-	-	10	(16,9)
• Bissexual	06	(13,6)	-	-	06	(10,2)
• Heterossexual	05	(11,4)	13	(86,7)	18	(30,5)
SANGÜÍNEA	12	(27,3)	04	(26,7)	16	(27,1)
• Usuário de Droga Injetável	11	(25,0)	03	(20,0)	14	(23,7)
• Transusão	01	(2,3)	01	(6,7)	02	(3,4)
IGNORADA	15	(34,1)	-	-	15	(25,4)
TOTAL	48	1,1/pac	17	1,1/pac	65	1,1/pac

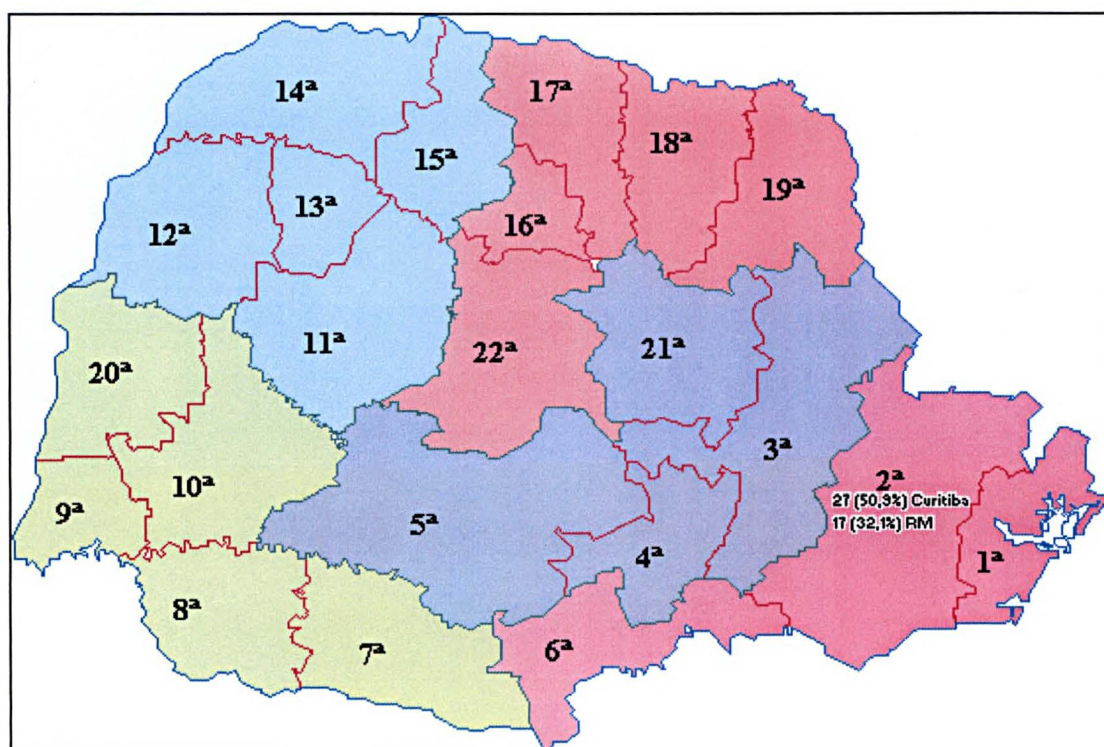
NOTA: Relatado mais de um tipo de exposição por paciente. Percentual calculado em razão do número de pacientes: 44, 15 e 59, respectivamente.

De modo geral, o tipo de exposição predominante foi a sexual (57,6%). Dos indivíduos estudados, 16 deles eram homossexuais ou bissexuais (27,1%), e 18 heterossexuais (30,5%). A categoria de exposição sangüínea que engloba os usuários de drogas injetáveis e os com transfusão correspondeu a 16 pacientes (27,1%). Em 15 pacientes (25,4%) a categoria de exposição foi ignorada ou não foi possível averiguar esta observação.

#### 4.1.2. Procedência

Entre aqueles que tinham informações de procedência (Quadro 1), 27 pacientes (50,9%) eram de Curitiba e 17 (32,1%) da Região Metropolitana (RM), nove pacientes (17,0%) de outras localidades, sendo que 4 (7,6%) provinham de outro estado. A figura 1 ilustra a procedência dos pacientes segundo as diferentes regiões do Estado do Paraná.

**FIGURA 1 - Mapa do Estado do Paraná com as Regionais de Saúde**



#### 4.2. Infecções oportunistas

As infecções oportunistas, isoladas ou associadas, mais frequentemente observadas concomitantes a candidíase oral, em 58 pacientes, foram: pneumonia por *Pneumocystis carinii* (PPc) em 18 pacientes (31,0%), diarreia crônica em 24 (41,4%)

e tuberculose pulmonar ou extra pulmonar em 18 (31,0%). Verificamos a associação de 2 infecções oportunistas em 24 pacientes (41,4%), sendo as mais freqüentes a diarreia (15 pacientes) e a pneumonia por *Pneumocystis carinii* e a tuberculose em 8 pacientes cada uma (Tabela 4).

No presente estudo, analisando 48 prontuários, observou-se que 12 pacientes (2%) eram virgens de tratamento em relação a antiretrovirais, 16 pacientes (33,3%) estavam sob terapia com dois inibidores de transcriptase reversa e 20 pacientes (41,66%) em tratamento antiretroviral triplo com inibidor de protease, que se iniciavam na ocasião da investigação; destes, 14 pacientes, ou seja, a maioria, apresentava menos de 1 mês de tratamento com esta associação, denominada HAART (*Highly Active AntiRetroviral Therapy*), portanto não se beneficiando da ação desta terapia, verificadas em estudos prospectivos. Os pacientes eram na sua maioria procedentes de Curitiba e Região Metropolitana de acordo com os dados obtidos na Vigilância Epidemiológica.

**TABELA 4 - Dados das infecções oportunistas concomitantes nos pacientes com AIDS**

INFECÇÕES OPORTUNISTAS	NÚMERO (n = 60)	(PERCENTUAL)
NÚMERO	92	1,6/paciente
• Nenhuma	02	(3,3)
• Uma	29	(48,4)
• Duas	24	(40,0)
• Três	05	(8,3)
TIPO	58	(96,7)
• Uma Infecção	29	(50,0)
• Broncopneumonia	01	(1,7)
• Diarreia	05	(8,6)
• Meningite Criptocócica	03	(5,2)

• Neurotoxoplasmose	05	(8,6)
• PPc	08	(13,8)
• Tb Ganglionar	03	(5,2)
• Tb Pleural	01	(1,7)
• Tb Pulmonar	03	(5,2)
• Duas Infecções	24	(41,4)
• PPc / Diarréia	03	(5,2)
• PPc / LEMFP	01	(1,7)
• PPc / Tb Pleural	01	(1,7)
• PPc / Tb Pulmonar	03	(5,2)
• Diarréia / Carcinoma Vulva	01	(1,7)
• Diarréia / Neurotoxoplasmose	02	(3,5)
• Diarréia / Pneumonia	05	(8,7)
• Diarréia / Retinite CMV	01	(1,7)
• Diarréia/Sepse Estafilocócica	01	(1,7)
• Diarréia / Tb	01	(1,7)
• Diarréia / Tb Pulmonar	01	(1,7)
• HPV / Herpes Zoster	01	(1,7)
• Pneumonia / HSV Genital	01	(1,7)
• Tb Pulmonar / Pneumonia	02	(3,5)
• Três	05	(8,6)
• Diarréia / HSV / Pneumonia	01	(1,7)
• Diarréia / Neurotoxoplasmose / Pneumonia	01	(1,7)
• PPc / Tb Pulmonar / Diarréia	02	(3,5)
• Tb Ganglionar/Pulmonar/ Sarcoma de Kaposi	01	(1,7)

---

#### 4.3. Candidíase oral

Em 43 pacientes (72,9%) observou-se extenso acometimento orofaríngeo por *Candida*, sendo que em 10 pacientes (16,9%) as lesões eram moderadas e em 6 pacientes (10,2%) leve.

As Figuras 2 e 3 apresentam lesões de candidíase oral.

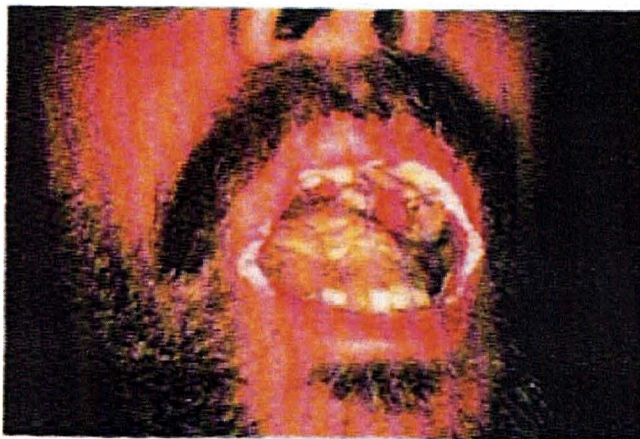
**FIGURA 2 – Candidíase oral leve**

Presença de placas esbranquiçadas, de candidíase oral em uma localização, notadamente em língua



**FIGURA 3 – Candidíase oral grave**

Extenso comprometimento de toda a mucosa oral em paciente com candidíase oral grave



#### 4.3.2. Episódios prévios de candidíase oral nas categorias de imunossupressão

Para análise da incidência de episódios prévios de candidíase oral em relação à contagem de linfócitos T CD4, os 56 pacientes foram divididos em dois grupos: 36 pacientes (64,3%) apresentavam imunossupressão grave, isto é, CD4 com até 50 células/mm<sup>3</sup> e 21 (37,5%) com CD4 acima de 50 células/mm<sup>3</sup>. No grupo estudado, 17 pacientes (30,4%) apresentaram episódio de candidíase oral como a primeira manifestação de imunossupressão, enquanto que em 40 pacientes (71,4%) havia relato de um ou mais episódios prévios.

Na população de pacientes com imunossupressão grave (36), as frequências foram de 10 (27,8%) e 26 (72,2%) pacientes, respectivamente, para nenhum e vários episódios prévios de candidíase (Tabela 6).

**TABELA 5 – Episódios prévios de candidíase oral nos pacientes**

##### **Imunossuprimidos**

CD4 (células/mm <sup>3</sup> )	NENHUM		UM OU MAIS		TOTAL	
	N.º	(%)	N.º	(%)	N.º	(%)
Até 50	10	(58,8)	26	(65,0)	36	(64,3)
Acima de 50	07	(41,2)	14	(35,0)	21	(37,5)
TOTAL	17	(30,4)	40	(71,4)	57	1,0/paciente

NOTA: Percentual calculado em razão do número de pacientes imunossuprimidos (56).

Análise Estatística:  $\chi^2_{\text{calc}} = 0,02$  ;  $p = 0,8870$

Não foi constatada diferença significativa entre os episódios prévios de candidíase oral e as categorias de imunossupressão ( $p=0,8870$ ).

Este resultado foi confirmado pela análise da variância (ANOVA), onde não foi possível estabelecer relação entre os níveis de CD4 e a frequência de episódios prévios de candidíase oral ( $F_{\text{calc}} = 3,64$  ;  $p=0,307$ ).

#### 4.4. Relação entre formas clínicas de candidíase oral e níveis de CD4

A distribuição das diferentes formas de candidíase oral em relação ao nível de linfócitos T CD4 mostrou que a maioria das lesões graves foram encontradas em pacientes com menor nível de linfócitos T CD4 ( $p=0,036$ ) (Tabela 7).

**TABELA 6 – Gravidade da candidíase oral e contagem de linfócitos T CD4, nos pacientes com AIDS**

CD4 (células/mm <sup>3</sup> )	LEVE		MODERADA		GRAVE		TOTAL	
	N.º	(%)	N.º	(%)	N.º	(%)	N.º	(%)
Até 50	01	(16,7)	07	(77,8)	28	(66,7)	36	(64,3)
Acima de 50	05	(83,3)	02	(22,2)	14	(33,3)	21	(37,5)
TOTAL	06	(10,7)	09	(16,1)	42	(75,0)	57	1,0/paciente

(1) Percentual calculado em razão do número total de pacientes (56).

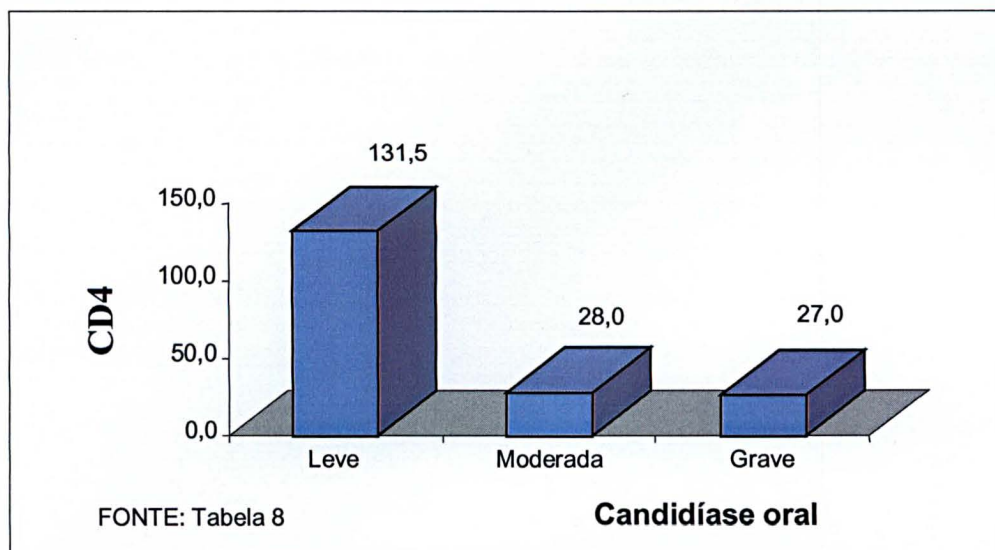
Análise Estatística:  $\chi^2_{\text{calc}} = 6,62$  ;  $p = 0,036$

A relação estabelecida entre gravidade da candidíase oral e nível de CD4 foi confirmada por análise de variância ( $F_{\text{calc}} = 9,33$  ;  $p<0,0001$  ; CV = 86,2%), sendo possível detectar diferença significativa ( $p<0,0001$ ) na frequência de diferentes tipos de lesão entre pacientes com linfócitos T CD4 superior ou inferior a 50. Para melhor avaliar essas diferenças comparou-se duas a duas a distribuição de tipos de lesões em função da contagem de linfócitos T CD4. (Tabela 8).

**TABELA 7 – Estatística descritiva dos linfócitos T CD4 e análise comparativa em relação à gravidade**

DADOS	N.º	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍN	MÁX	MEDIANA
GRAVIDADE / CD4						
• Leve	06	126,2	56,3	46,0	199,0	131,5
• Moderada	09	46,7	45,3	15,0	129,0	28,0
• Grave	42	42,8	42,6	0,0	167,0	27,0
ANÁLISE ESTATÍSTICA						
• Leve x Moderada	2,536		Mann-Whitney	p = 0,011	S	
• Leve x Grave	3,056		Mann-Whitney	p = 0,002	S	
• Moderada x Grave	0,618		Mann-Whitney	p = 0,537	NS	





**FIGURA 4 – Relação entre CD4 e gravidade da candidíase oral**

Nesta avaliação pode-se constatar que os pacientes com lesões leves apresentaram níveis de contagem de linfócitos T CD4 elevados, diferenciando-se do comportamento exibido por pacientes com lesões moderada e grave cuja contagem de linfócitos T CD4 foi homogeneamente baixa (Figura 4).

#### **4.5. Avaliação do uso de antifúngicos no tratamento de episódios prévios de candidíase oral**

Na avaliação do uso prévio de compostos azólicos e poliênicos tópicos na terapêutica antifúngica, dos 56 pacientes, foi possível observar que 26 (46,4%) eram virgens de tratamento, enquanto que 53,6% foram submetidos a algum tipo de tratamento a saber, poliênico tópico (nistatina), azólico (cetoconazol, fluconazol) ou associação seqüencial de poliênico tópico e azólico (Tabela 9, Tabela 10).

**TABELA 8 – Avaliação do uso prévio de compostos azólicos e poliênicos tópicos na terapêutica de candidíase oral e contagem de linfócitos T CD4 nos pacientes com AIDS**

CD4 (células/mm <sup>3</sup> )	SEM TRATAMENTO		AZÓLICA SISTÊMICA		POLIÊNICA TÓPICA		TÓPICA E SISTÊMICA		TOTAL	
	N.º	(%)	N.º	(%)	N.º	(%)	N.º	(%)	N.º	(%)
Até 50	15	(57,7)	07	(87,5)	10	(76,9)	04	(40,0)	36	(64,3)
Acima de 50	11	(42,3)	01	(12,5)	03	(23,1)	06	(60,0)	21	(37,5)
TOTAL	26	(46,4)	08	(14,3)	13	(23,2)	10	(17,9)	57	1,0/pac

(1) Percentual calculado em razão do número de total de pacientes (56).

Análise Estatística:  $\chi^2_{\text{calc}} = 5,73$  ;  $p = 0,165$

**TABELA 9 – Dados dos pacientes com AIDS em relação ao tratamento tópico e o uso de medicação**

DADOS	NÚMERO (n = 59)	(PERCENTUAL)
TRATAMENTO TÓPICO		
• Não	37	(62,7)
• Sim	22	(37,3)
ANTIFÚNGICO SISTÊMICO		
• Não	42	(71,2)
• Sim	17	(28,8)
• FCZ	07	(41,2)
• CTZ	07	(41,2)
• CTZ + FCZ	03	(17,6)
AVALIAÇÃO / CD4		
• Sem Tratamento		26
• Média ± desvio padrão	57,8 ± 46,4	
• Mínimo e máximo	3,0 e 169,0	
• Mediana	39,5	
• Azólica Sistêmica		08
• Média ± desvio padrão	23,5 ± 41,1	
• Mínimo e máximo	0,0 e 124,0	
• Mediana	10,0	
• Poliênica Tópica		13
• Média ± desvio padrão	43,8 ± 58,5	
• Mínimo e máximo	1,0 e 199,0	
• Mediana	27,0	
• Tópica e Sistêmica		10
• Média ± desvio padrão	71,4 ± 52,3	
• Mínimo e máximo	6,0 e 167,0	
• Mediana	81,0	

Não houve relação entre uso prévio de antifúngicos e maior depressão do número de linfócitos T CD4 ( $p=0,165$ ), também confirmados pela análise da variância ( $F_{\text{calc}} = 1,62$  ;  $p=0,197$  ;  $CV = 95,7\%$ ).

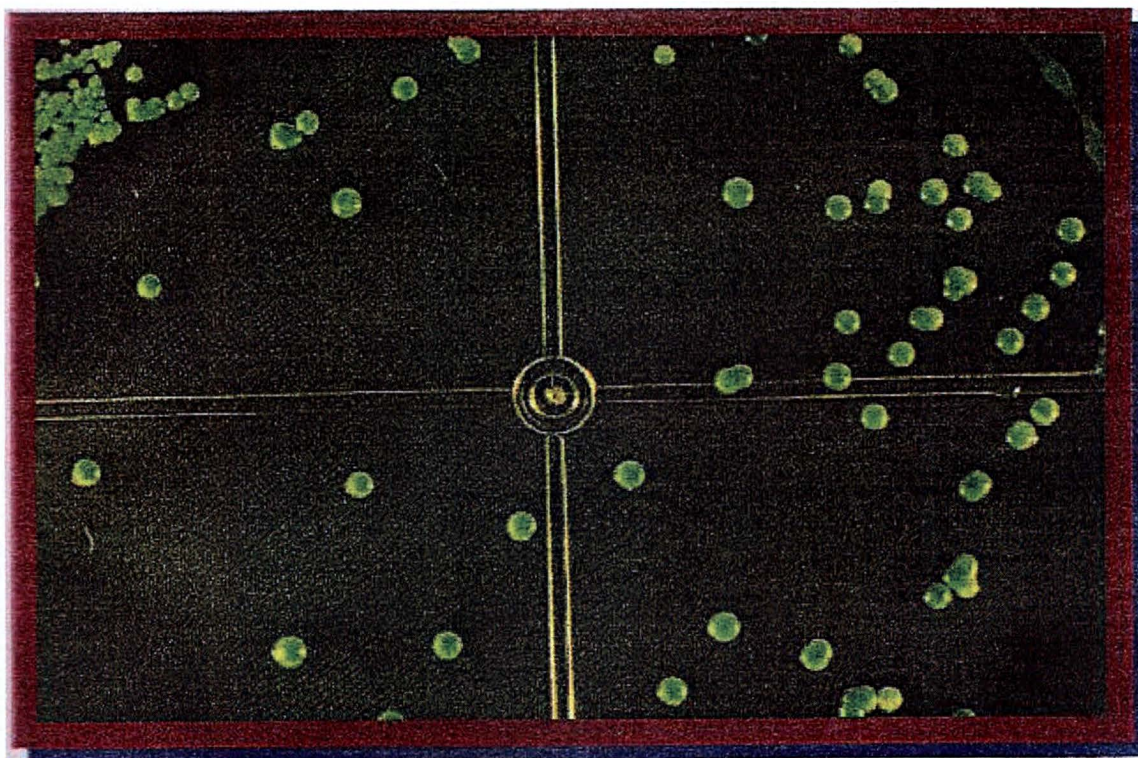
#### **4.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

##### **4.6.1. Avaliação de dois métodos de coleta e processamento de amostras biológicas para diagnóstico de candidíase oral**

Houve recuperação do agente etiológico em 100,0% dos episódios de candidíase oral, independente do sistema de coleta ou meio de cultivo utilizado. Vale salientar que material e tempo necessário para processamento de cultura por técnica de bochecho foi maior que aquele necessário para *swab*.

##### **4.6.2. Identificação de espécies isoladas**

Em todos os episódios estudados de candidíase oral foram identificados *Candida albicans*. Foi possível documentar apenas um caso de co-infecção por *Candida albicans* e *Candida (T.) glabrata* que foi reconhecido apenas pela cultura de material em meio CHROMagar® *Candida* onde se observou crescimento de colônias com pigmentação diferente.



**FIGURA 5 - CHROMagar® *Candida***

#### **4.7. Perfil de suscetibilidade**

Todas as amostras de *Candida albicans* analisadas mostraram alta suscetibilidade *in vitro* frente aos antifúngicos testados (Tabela 11).

**TABELA 10 – Perfil de suscetibilidade de *Candida albicans* aos antifúngicos**

ANTIFÚNGICO	VARIAÇÃO DA CIM	CIM 50 <sup>(1)</sup>	CIM 90 <sup>(2)</sup>
Fluconazol	0,125 - 4,000	0,25	1,00
Itraconazol	0,007 - 0,060	0,03	0,06
Cetoconazol	0,015 - 0,125	0,03	0,06
Anfotericina B	0,060 - 0,500	0,25	0,50

NOTA: Concentração inibitória em  $\mu\text{g/ml}$ .

(1) Concentração inibitória mínima a 50%.

(2) Concentração inibitória mínima a 90%.

A única amostra de *C. glabrata* isolada foi no paciente número 9, associada a extensa lesão de candidíase oral, apresentou valores de CIM aos antifúngicos de:

- Fluconazol - 8  $\mu\text{g/ml}$
- Itraconazol - 0,125  $\mu\text{g/ml}$
- Cetoconazol - 0,25  $\mu\text{g/ml}$
- Anfotericina B - 0,25  $\mu\text{g/ml}$ .

Nenhum caso isolado foi reconhecido como resistente ou intermediário (DDS), usando-se os critérios sugeridos pelo NCCLS.

**TABELA 11 – Perfil de suscetibilidade de *Candida albicans* aos antifúngicos conforme o nível de CD4**

ATÉ 50 (células/mm <sup>3</sup> )			
ANTIFÚNGICO	Variação da CIM	CIM 50 <sup>(1)</sup>	CIM 90 <sup>(2)</sup>
Fluconazol	0,125 - 4,000	0,25	0,50
Itraconazol	0,007 - 0,060	0,03	0,06
Cetoconazol	0,015 - 0,125	0,03	0,06
Anfotericina B	0,125 - 0,500	0,25	0,50
ACIMA DE 50 (células/mm <sup>3</sup> )			
ANTIFÚNGICO	Variação da CIM	CIM 50 <sup>(1)</sup>	CIM 90 <sup>(2)</sup>
Fluconazol	0,125 - 1,000	0,25	0,50
Itraconazol	0,015 - 0,060	0,03	0,06
Cetoconazol	0,015 - 0,030	0,03	0,03
Anfotericina B	0,060 - 0,500	0,25	0,25

NOTA: Concentração inibitória em  $\mu\text{g/ml}$ .

(1) Concentração inibitória mínima a 50.

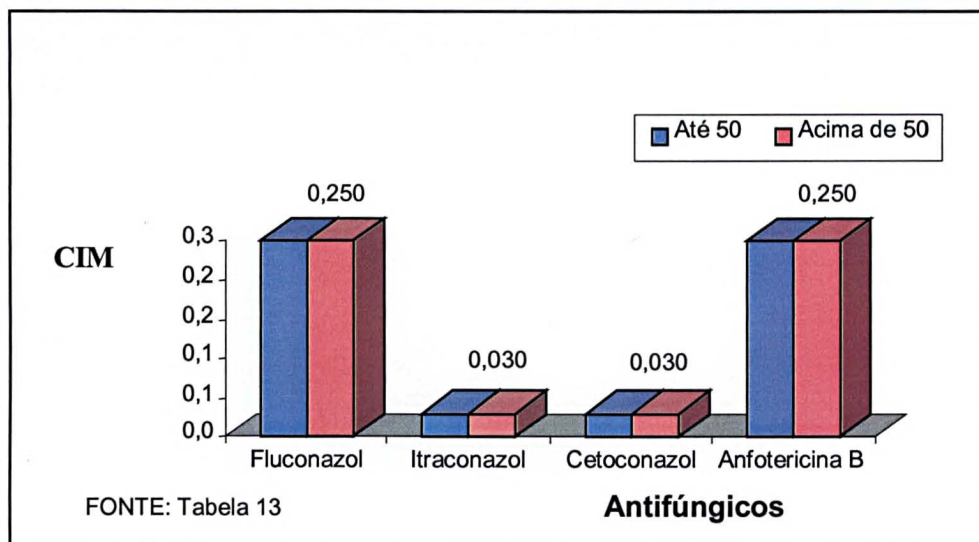
(2) Concentração inibitória mínima a 90.

Conforme ilustram a Tabela 12, a Tabela 13 e a Figura 6, não houve diferença significativa nos perfis de suscetibilidade de amostras provenientes de pacientes com diferentes níveis de evolução da doença HIV ilustrada pela contagem de linfócitos T CD4.



**TABELA 12 – Estatística descritiva do perfil de suscetibilidade e análise comparativa em relação aos antifúngicos**

DADOS	N.º	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍN.	MÁX.	MEDIANA
<b>ATÉ 50 (células/mm<sup>3</sup>)</b>						
• Fluconazol	36	0,472	0,747	0,125	4,000	0,250
• Itraconazol	36	0,039	0,021	0,007	0,060	0,030
• Cetoconazol	36	0,034	0,027	0,015	0,125	0,030
• Anfotericina B	36	0,267	0,116	0,125	0,500	0,250
<b>ACIMA DE 50 (células/mm<sup>3</sup>)</b>						
• Fluconazol	21	0,280	0,256	0,125	1,000	0,250
• Itraconazol	21	0,032	0,019	0,015	0,060	0,030
• Cetoconazol	21	0,023	0,008	0,015	0,030	0,030
• Anfotericina B	21	0,223	0,118	0,060	0,500	0,250
<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>						
• Fluconazol	1,028		Mann-Whitney	p = 0,304	NS	
• Itraconazol	1,074		Mann-Whitney	p = 0,283	NS	
• Cetoconazol	1,477		Mann-Whitney	p = 0,140	NS	
• Anfotericina B	1,186		Mann-Whitney	p = 0,236	NS	



**FIGURA 6 – Perfil de suscetibilidade em relação aos níveis de CD4**

## 5. DISCUSSÃO

Candidíase oral é uma infecção muito freqüente nos pacientes com AIDS. Embora não ponha em risco a vida do doente, é importante fator de morbidade, além de denunciar o grau de imunossupressão, por sua relação com o número de CD4 (DATRY, 1992; DUPONT et alii, 1994). Esta entidade clínica tem sido pouco investigada em nosso meio.

Os pacientes incluídos na presente investigação corresponderam ao padrão epidemiológico clássico da AIDS. A maioria dos pacientes era adulto jovem, com mediana de idade de 33,9 anos, 75% dos quais pertenciam ao sexo masculino.

Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2000) até junho de 2000, a faixa etária mais atingida situava-se entre 20 a 44 anos (80,8%), contando-se uma mulher com a doença para cada três homens atingidos, e em relação à escolaridade observava-se o predomínio da baixa escolaridade.

A média de tempo de doença foi de 6,7 meses e a média da contagem de linfócitos T CD4 foi de 52,2 células/mm<sup>3</sup> (variação de 0 a 199). Vale salientar que 61% dos pacientes estudados apresentavam contagem de linfócitos T CD4 menor ou igual a 50 células/mm<sup>3</sup> caracterizando pacientes com imunossupressão grave e acompanhados de infecções oportunistas em 50% dos casos. As infecções oportunistas isoladas ou associadas mais freqüentemente observadas foram: pneumonia por *Pneumocystis carinii* (31%), diarreia crônica (41,4%) e tuberculose pulmonar ou extra pulmonar (31%).

É sabido que o uso de terapia antiretroviral intensa, incluindo inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos (ITRN) + inibidor da protease (IP), reduziu a mortalidade e morbidade devida à AIDS, de 29,4/100 pessoas por ano em 1995, para 8,8/100 pessoas por ano no segundo trimestre de 1997, tendo a incidência das infecções oportunistas (pneumonia por *Pneumocystis carinii*, doença por *Mycobacterium avium* complexo *intracellulare* e por citomegalovírus) diminuído de 21,9/100 pessoas por ano em 1994 para 3,7/100 pessoas por ano em meados de 1997 (PALELLA et alii, 1998).

Segundo DIZ DIOS et alii, 1999, o uso de inibidor de protease reduz a frequência de candidíase orofaríngea relacionada à AIDS. CAUDA et alii, 1999, observaram durante um ano dois grupos de pacientes, com e sem uso de IP e verificaram que candidíase oral foi diagnosticada em 36% dos pacientes sem IP, comparados com 7% dos pacientes em uso de IP, dados estes estatisticamente significativos. O mecanismo envolvido é desconhecido, mas verifica-se que a redução da carga viral e conseqüente recuperação imunológica poderia ser responsável por estes eventos, outrossim, de especial interesse a similaridade da classe de protease (prótese aspártica secretória) de *Candida albicans* e do inibidor de protease, sugerindo que a inibição pelas drogas antiretrovirais notadamente o inibidor de protease sobre este importante fator de virulência de *Candida albicans* resultaria em baixas taxas de colonização e candidíase oral manifesta (HOEGL et alii, 2000).

A avaliação da cavidade oral para caracterização da extensão da candidíase, permitiu verificar que 43 pacientes (72,9%) apresentavam extenso comprometimento orofaríngeo por *Candida*. É sabido que, na infecção pelo HIV, a



candidíase pseudo-membranosa pode ocorrer em 80% a 95% dos pacientes com AIDS (HEINIC et alii, 1993).

Porém, verificando-se a relação entre as formas clínicas de candidíase orofaríngea e CD4, os pacientes com formas leves apresentaram níveis médios de CD4 de 126,2 células/mm<sup>3</sup> e os pacientes com formas clínicas moderadas e graves apresentaram, respectivamente, valores médios de 46,7 e 42,8 células/mm<sup>3</sup>, diferença esta estatisticamente significativa.

SAMARANAYAKE et alii, 1992, em seu estudo de prevalência de variantes clínicas de candidíase oral com dados acumulados de 23 estudos (incorporando 3387 pacientes adultos) verificaram que a candidíase oral podia se desenvolver em 1/3 a 1/2 dos pacientes HIV+, onde as variantes eritematosas e pseudomembranosas apresentavam equivalência de casos. A frequência de isolamentos de *Candida* e sinais clínicos de candidíase aumentam com a progressão da infecção pelo HIV (KLEIN et alii, 1984; REICHERT et alii, 1987; KORTING et alii, 1989; SCHULTEN et alii, 1989; PORTER et alii, 1989).

Com relação à caracterização microbiológica e perfil de suscetibilidade, o presente estudo, com dois diferentes procedimentos para recuperação do agente etiológico, mostrou que ambos eram eficazes para a recuperação do microrganismo, porém o método do bochecho tecnicamente mais complexo, exigindo maior gasto de tempo, era mais trabalhoso, dado os passos a serem efetuados por ocasião da separação da alíquota para cultura. O *swab* foi menos trabalhoso e bastante eficaz na recuperação do agente etiológico, valioso como método altamente difundido para coleta de amostra oral, parte da rotina diária dos laboratórios.

Na avaliação das culturas dos isolados, observamos que todos os 59 pacientes encontravam-se infectados por *C. albicans* e, em uma amostra, por outra espécie de levedura, representada por *C. (T.) glabrata*.

Os meios de cultura cromogênico e o clássico apresentaram-se eficazes na recuperação do agente etiológico; entretanto o meio cromogênico permitiu a identificação de um único caso de coinfeção de *C. albicans* e *C. (T.) glabrata*.

REVANKAR et alii, 1996, no seu estudo da epidemiologia e significado de resistência de *C. albicans* ao fluconazol acompanharam 50 pacientes HIV+, que apresentaram leveduras resistentes (MIC>8µg/ml) em 16 deles (32%); 7 (14%) tinham *C. albicans* resistente e 7 (14%) *Candida* não *albicans* resistente e 2 (4%) tinham leveduras mistas resistentes. O uso prévio de fluconazol e grave imunossupressão foram fatores de risco para desenvolver resistência, porém alguns não fizeram uso prévio de fluconazol, mas eram gravemente imunossuprimidos e havia pacientes que receberam acima de 10g de fluconazol e não apresentavam isolados resistentes na cultura. Estes autores sugerem que o uso prévio somente de fluconazol não é o único fator para o desenvolvimento de resistência.

BARCHIESI et alii, 1998, em seu trabalho prospectivo de avaliação de 45 pacientes HIV+ para detectar o desenvolvimento de resistência ao fluconazol e analisar a epidemiologia da candidíase oral, dos 106 episódios de candidíase oral diagnosticados nestes pacientes, verificaram cura completa em

28%, melhora em 65%, e falha em 7% com fluconazol 100 mg/dia para o tratamento de candidíase oral em paciente HIV+.

A maioria dos pacientes HIV+ é infectada com somente uma cepa de *C. albicans* através de cada episódio de infecção, embora alguns indivíduos HIV+ possam simultaneamente abrigar cepas de *C. albicans* com diferentes padrões de suscetibilidade do fluconazol.

O isolamento de cepas de *C. albicans* resistente a este regime de fluconazol *in vitro*, bem com *in vivo*, são raros na literatura. No nosso estudo, independente do CD4 e da presença de infecções oportunistas, todas as amostras foram suscetíveis aos antifúngicos testados. A menor exposição dos pacientes à terapêutica com azólicos, bem como a maior utilização de terapêutica tópica com poliênicos, podem justificar a ausência de espécies não *albicans* e leveduras resistentes a antifúngicos em nosso material clínico.

A padronização recente dos métodos mostra que o teste de suscetibilidade é reprodutível e apresenta boa correlação clínica. Vários são os trabalhos, em pacientes com AIDS e candidíase orofaríngea, em que a correlação clínico-laboratorial de dados de CIM geradas pela metodologia padronizada pelo NCCLS, são preditivos da evolução terapêutica com a droga testada (COLOMBO, 1999).

REX, 1997, cita quatro princípios-chave para a interpretação de testes de suscetibilidade: 1) Um MIC não é medida física ou química; 2) Fatores do hospedeiro são freqüentemente mais importante do que o teste de suscetibilidade em determinar o sucesso clínico; 3) A suscetibilidade *in vitro* não prediz sucesso terapêutico; 4) A resistência *in vitro* freqüentemente prediz falha

terapêutica. Na prática, todos estes fatores devem ser analisados ao se interpretar um teste de suscetibilidade.

Na presente análise não houve diferença significativa entre os episódios prévios de candidíase oral e as categorias de imunossupressão; contudo salienta-se que a maioria dos pacientes em estudo 40 (71,4%) apresentou um ou mais episódios prévios de candidíase oral, um dado que já indica imunossupressão avançada e que não dependia da classificação em grupos mais severamente imunossuprimidos.

A maioria das lesões graves nesta série foi encontrada em pacientes com menor nível de linfócitos T CD4. Pacientes com forma leve de candidíase apresentaram linfócito T CD4 mais elevado e os que apresentaram formas moderada e grave tenderam a se apresentar com distribuição semelhante de CD4.

No presente estudo verificou-se que havia diferença estatisticamente significativa quando se comparavam formas leves de candidíase e formas moderadas, assim como entre as formas leves e formas graves de candidíase, em relação à contagem de linfócitos T CD4, isto é, houve diferença entre lesões leves, moderadas e graves que dependiam da imunossupressão.

Quanto à avaliação da frequência de uso de antifúngicos, a população estudada consistiu de pacientes com imunossupressão avançada (linfócito T CD4 < 50) e com infecções oportunistas, e em 26 deles (46,4%), sem uso prévio de antifúngicos, identificou-se que não foram submetidos a nenhum contato com antifúngicos tópicos e/ou sistêmicos. O pouco uso de fluconazol pela população HIV positiva em nosso estudo reflete o baixo consumo de fluconazol por esta população em Curitiba neste período, contrário ao encontrado na

literatura, que mostra pacientes HIV positivos imunossuprimidos graves com uso prévio e prolongado de terapia azólica sistêmica para o tratamento de candidíase orofaríngea recorrente e com tendências para o aparecimento de resistência ao fluconazol (SANGUINETTI et alii, 1993; GREENSPAN, et alii, 1994; MAENZA et alii, 1996; BAILY et alii, 1994; WHITE et alii, 1998).

CARTELEDGE, MIDGLEY, GAZZARD, 1998, referem que a transmissão de cepas de *C. albicans* fluconazol resistente entre pacientes HIV+ e seus parceiros sexuais pode ocorrer. Candidíase recorrente é atribuída à recidiva com a mesma cepa ou reinfecção com uma nova cepa, e ambos os mecanismos têm sido associados com cepas fluconazol resistentes.

Segundo BARCHIESI et alii, 1995, a transmissão de *Candida* fluconazol resistente entre pacientes com AIDS e candidíase oral é documentada por eletroforese em gel pulsátil. A possibilidade de transmissão pessoa a pessoa de infecção por *C. albicans* fluconazol resistente confirma a importância de técnicas moleculares na seqüência investigacional de isolados de *C. albicans* de pacientes com AIDS e candidíase oral. O isolamento de *C. albicans* fluconazol resistente de pacientes após tratamento com fluconazol por tempo prolongado é um fenômeno comum.

Conforme FICHTENBAUM & POWDERLY, 1998, os dois princípios mais importantes para evitar doença refratária (candidíase refratária e resistente) são retardar o início ou reverter a imunossupressão e eliminar a exposição desnecessária à terapia antifúngica.

POWDERLY et alii, 1995; REEF & MAYER, 1995, acham que, embora estudos clínicos prospectivos controlados mostrem que a profilaxia com

fluconazol possa reduzir o risco de candidíase mucosa com HIV avançado, a profilaxia primária de rotina não é recomendada por causa da efetividade da terapia da doença aguda, baixa mortalidade associada com candidíase mucosa, potencial para desenvolvimento de infecção por *Candida* droga resistente e custo da profilaxia. A probabilidade de recorrência aumenta à medida que o CD4 diminui. Muitos trabalhos não recomendam profilaxia crônica para prevenir candidíase orofaríngea e vulvovaginal recorrente, pelas mesmas razões que a profilaxia primária não é recomendada. Entretanto, se as recorrências são freqüentes ou graves seguindo-se à candidíase esofágica, a terapia supressiva a longo prazo deve ser considerada.

MAENZA et alii, 1997, ao avaliarem a prevalência e a microbiologia de infecção oral por *Candida* fluconazol resistente em 100 pacientes com AIDS e CD4 menor que 200 células/mm<sup>3</sup> encontraram em 26/64 pacientes (41%) *Candida albicans* com MIC>8µg/ml, demonstrando resistência *in vitro* e que apresentou correlação com candidíase clínica. As características destes pacientes eram: CD4 baixo (média de 9), um grande número de episódios prévios de candidíase tratados (média 4,5) e média de duração do tratamento prévio de 231 dias. As culturas de espécimes de 64 dos pacientes foram positivos para fungos identificados com meio de cultura padrão para *C.albicans* apenas em 45 pacientes e em combinação com outro organismo em cinco pacientes. Os organismos adicionais foram identificados pelo uso de CHROMagar® *Candida* em 16 culturas. Organismos identificados nestas culturas mistas indicaram *C. albicans* e *C. (T.) glabrata*, *Sacharomyces cerevisiae*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

JOHNSON et alii, 1995, ao examinar diferentes regimes de tratamento com fluconazol para a emergência de resistência ao azólico entre espécies de *Candida* recuperadas de 54 pacientes HIV+, sugerem que a terapia a longo prazo é um importante fator no desenvolvimento de resistência, assim como a resistência foi rara e transitória em pacientes recebendo tratamento intermitente por curto período.

REDDING et alii, 1994, descrevem um paciente com episódios recorrentes de candidíase orofaríngea que requerem doses progressivas de fluconazol para o controle da infecção. Durante os episódios de 1 a 9, a dose de 100mg/dia de fluconazol foi suficiente para resposta clínica, porém a CIM gradualmente aumentou de 0,25 a 8 µg/ml e este aumento foi visto durante os episódios de 10 a 14, mas estes episódios ainda responderam a doses aumentadas de fluconazol de 200, 400 e finalmente 800mg/dia. Entretanto, após um período de dois anos de uso de fluconazol para o tratamento de infecções recorrentes, o episódio 15 não respondeu ao fluconazol sendo necessária a adição de anfotericina B. A CIM para fluconazol era acima de 64 mg/ml. Resultados de subtipagem por DNA demonstrou a persistência da mesma *C.albicans* através destes dois anos de terapia com fluconazol. O isolado resistente freqüentemente parece ser do mesmo genótipo que o isolado inicial, conforme encontrado pelos seguintes autores: BART-DELABESSE et alii, 1993; POWDERLY et alii, 1993; MILLON et alii, 1994<sup>a</sup>; SANGEORZAN et alii, 1994; VUFFRAY et alii, 1994; embora a aquisição de novas cepas infectantes possa ocorrer (BART-DELABESSE et alii, 1993; SANGEORZAN et alii, 1994).

Estudo efetuado por MILLAN, 1998, mostra elevado índice de isolamento de leveduras na cavidade oral de pacientes com AIDS (82,6%) com predomínio de *C. albicans* e o predomínio de *C. (T.) glabrata* e *C. kruzei* entre as espécies não *albicans* isoladas, sendo raro o encontro de *C. albicans* resistente aos azólicos testados.

Na presente casuística, nos deparamos com pacientes graves, com uma ou mais infecções oportunistas que se apresentavam bastante imunossuprimidos e com pouco manuseio de antifúngicos, refletindo o achado de 100% de *C. albicans*. Não houve emergência de espécies não *albicans* resistentes aos antifúngicos.

Muitos avanços têm ocorrido na terapia antifúngica nestas últimas três décadas, sendo o itraconazol e o fluconazol as drogas mais promissoras (SAAG & DISMUKES, 1988). Entretanto novas preparações destes azólicos mostram resultados promissores, mesmo em infecções decorrentes de isolados resistente ao fluconazol (CARTLEDGE, MIDGLEY, GAZZARD, 1997; REYNES et alii, 1997; DAROUICHE, 1998; GRAYBIL et alii, 1998; PHILLIPS et alii, 1998), além de novas e promissoras drogas antifúngicas (GRAYBIL, 2000).

A partir deste estudo foi possível encontrar e constatar o grande número de relatos de resistência aos azólicos, notadamente fluconazol, e verificar a ausência deste achado no nosso levantamento; contudo foi possível verificar que vários fatores podem contribuir para resistência às drogas antifúngicas, fatores relacionados aos fungos, às drogas e aos do hospedeiro que poderão permitir novas e futuras investigações.



## 6. COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

1. O método de menor custo e melhor operacionalização para obtenção de material de orofaringe de pacientes com AIDS e candidíase oral pseudomembranosa foi o de *swab*.
2. Para isolamento de leveduras de candidíase oral no presente estudo, os dois meios de cultura utilizados, Sabouraud e CHROMagar®, apresentaram 100% de positividade, sendo o meio cromogênico mais eficaz por identificação direta dos tipos de *Candida*.
3. Quanto à extensão do acometimento de mucosa por candidíase orofaríngea foi possível estabelecer correlação entre a gravidade da candidíase oral e os níveis de CD4.
4. *Candida albicans* foi isolada em 100% dos episódios, havendo apenas 1 paciente que exibiu infecção mista por *Candida albicans* e *Candida (T.) glabrata*.
5. Todos os isolados foram sensíveis aos antifúngicos testados, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B, apesar do estado avançado dos pacientes.
6. A menor exposição dos pacientes à terapêutica com azólicos, bem como a maior utilização de terapêutica tópica com poliênicos, podem justificar a ausência de espécies não *albicans* e leveduras resistentes a antifúngicos em nosso material clínico.

## 7. ANEXOS

### ANEXO 1

NOME:	_____	REG.:	_____
HC	_____	HOC	_____
DATA:	_____ / _____ / _____		
ENDEREÇO:	_____		
MUNICÍPIO:	_____	FONE:	_____
IDADE:	_____	SEXO:	_____
RAÇA:	_____	PROFISSÃO:	_____
NATURALIDADE:	_____	ESTADO:	_____
DATA DO DIAGNÓSTICO DA AIDS:	_____ / _____ / _____		
INFECÇÃO OPORTUNÍSTICA PRÉVIA?	_____	QUAIS:	_____
INFECÇÃO OPORTUNÍSTICA CONCOMITANTE?	_____	QUAIS:	_____
Nº. DE EPISÓDIOS DE CANDIDÍASE OROFARINGEANA:	0-5 _____	5-10 _____	>QUE 10 _____
TTO ANTIFÚNGICO ANTERIOR?	TOPICO? _____	SISTÊMICO?	_____
DATA E DURAÇÃO DOS TRATAMENTOS:	_____		

### EXAME ORAL

ACHADO CLÍNICO	PRESENTE	AUSENTE	BEC*	MEC*
DENTES				
PRÓTESE				
EXTENSÃO CANDIDÍASE	LEVE	MODERADA	GRAVE	

DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO DIRETO: \_\_\_\_\_ CULTURA: \_\_\_\_\_  
TUBO GERMINATIVO: (+) \_\_\_\_\_ (-) \_\_\_\_\_  
IDENTIFICAÇÃO: \_\_\_\_\_

**SENSIBILIDADE *IN VITRO***

Fluconazol	
Itraconazol	
Cetoconazol	
Anfotericina B	

## **ANEXO 2**



## **ANEXO 3**



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARENDORF, T.M. & WALKER, D.M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Arch. Oral Biol.**, **25** (1): 1-10, 1980.
2. ARENDRUP, M.; STENNERUP, J.; ANDERSEN, L.P. How to discriminate between *Candida albicans* and non-*albicans* isolates in a routine laboratory of Clinical Microbiology. In: 39<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1999. **Abstract 145**, San Francisco, 1999. p. 541.
3. ATKINSON, J.C.; YEH, C.; OPPENHEIM, F.G.; BERMUDEZ, D.; BAUM, B.J.; FOX, F.C. Elevation of salivary antimicrobial proteins following HIV-1 infection. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **3** (1): 41-48, 1990.
4. AUGER, P.; DUMAS, C.; JOLY, J. A study of 666 strains of *Candida albicans*: correlation between serotypes and susceptibility to 5-fluorocytosine. **J. Infect. Dis.**, **139** (5): 590-594, 1979.
5. BAILY, G.G.; PERRY, F.M.; DENNING, D.W.; MANDAL, B.K. Fluconazole-resistant candidosis in an HIV cohort. **AIDS**, **8** (6): 787-792, 1994.
6. BALISH, E. & PHILLIPS, A.W. Growth, morphogenesis, and virulence of *Candida albicans* after oral inoculation in the germ-free and conventional chick. **J. Bacteriol.**, **91** (5): 1736-1743, 1966.
7. BARCHIESI, F.; COLOMBO, A.; McGOUGH, D.A.; FOTHERGILL, A.W.; RINALDI, M.G. In vitro activity of itraconazole against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **38** (7): 1530-1533, 1994a.
8. BARCHIESI, F.; COLOMBO, A.L.; McGOUGH, D.A.; FOTHERGILL, A.W.; RINALDI, M.G. In vitro activity of a new antifungal triazole, D0870, against *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **38** (11): 2553-2556, 1994b.



9. BARCHIESI, F.; NAJVAR, L.K.; LUTHER, M.F.; SCALISE, G.; RINALDI, M.G.; GRAYBILL, J.R. Variation in fluconazole efficacy for *Candida albicans* strains sequentially isolated from oral cavities of patients with AIDS in an experimental murine candidiasis model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **40** (5): 1317-1320, 1996.
10. BARCHIESI, F.; ASZENI, D.; DEL PRETE, M.S.; SINICCO, A. ; DI FRANCESCO, L.F.; PASTICCI, M.B.; LAMURA, L.; NUZZO, M.M.; BURZACCHINI, F.; COPPOLA, S.; CHIODO, F.; SCALISE, G. Fluconazole susceptibility and strain variation of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients with oropharyngeal candidosis. **J. Antimicrob. Chemother.**, **41** (5): 541-548, 1998.
11. BARRY, A.L. & BROWN, S.D. Fluconazole disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species. **J. Clin. Microbiol.**, **34** (9): 2154-2157, 1996.
12. BART-DELABESSE, E.; BOIRON, P.; CARLLOTI, A.; DUPONT, B. *Candida albicans* genotyping and studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole. **J. Clin. Microbiol.**, **31** (11): 2933-2937, 1993.
13. BERNAL, S.; MARTÍN MAZUELOS, E.; GARCÍA, M.; ALLER, A.I.; MARTINEZ, M.A.; GUTIÉRREZ, M.J. Evaluation of CHROMagar® *Candida* medium for the isolation and presumptive identification of species of *Candida* of clinical importance. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **24** (4): 201-204, 1996.
14. BLATCHFORD, N.R. Treatment of oral candidosis with itraconazole: a review. **J. Am. Acad. Dermatol.**, **23** (3 Pt 2): 565-567, 1990.
15. BODEY, G.P. Azole antifungal agents. **Clin. Infect. Dis.**, **14** (suppl 1): S161-S169, 1992.
16. BOKEN, D.J.; SWINDELLS, S.; RINALDI, M.G. Fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Clin. Infect. Dis.**, **17** (6): 1018-1021, 1993.
17. BORROMEO, G.L.; McCULLOUGH, M.J.; READE, P.C. Quantitation and morphotyping of *Candida albicans* from healthy mouths and from mouths affected by erythematous candidosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, **30** (6): 477-480, 1992.

18. BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST/AIDS. **Boletim Epidemiológico (AIDS)**. Ano XIII N.º 1, Brasília, Junho, 2000
19. BRAWNER, D.L. & CUTLER, J.E. Oral *Candida albicans* isolates from non-hospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, **27** (6): 1335-1341, 1989.
20. CAUDA, R.; TACCONELLI, E.; TUMBARELLO, M.; MORACE, G.; DE BERNARDIS, F.; TOROSANTUCI, A.; CASSONE, A. Role of protease inhibitors in preventing recurrent oral candidosis in patients with HIV infection: a prospective case-control study. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **21** (1): 20-25, 1999.
21. CANDIDO, R.C.; AZEVEDO, R.V.P.; ITO, I.I. Yeasts: the prevalence in the oral cavity of individuals with or without denture. **Rev. Odontol. UNICID**, **7** (1): 27-33, 1995.
22. CARTLEDGE, J.D.; MIDGLEY, J.; GAZZARD, B.G. Clinically significant azole cross-resistance in *Candida* isolates from HIV-positive patients with oral candidosis. **AIDS**, **11**: 1839-1844, 1997.
23. CARTELEDGE, J.D.; MIDDLEY, J.; GAZZARD, B.G. Transmission of fluconazole-resistant *Candida* strains between HIV-positive patients and their sexual partners. **AIDS**, **12** (10): 1249-1251, 1998.
24. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **MMWR**, **41** (RR-17): 1-19, 1992.
25. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. First 500.000 AIDS cases, United States, 1995. **MMWR**, **44**: 849-868, 1995.
26. CHALLACOMBE, S.J. Immunologic aspects of oral candidiasis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, **78** (2): 202-210, 1994.
27. CHAVANET, P.; LOPEZ, J.; GRAPPIN, M.; BONNIN, A.; DUONG, M.; WALDNER, A.; BUISSON, M.; CAMERLYNCK, P.; PORTIER, H. Cross-

sectional study of the susceptibility of *Candida* isolates to antifungal drugs and *in vitro-in vivo* correlation in HIV infected patients. **AIDS**, **8** (7): 95-950, 1994.

28. CHAVE, J.P.; CAJOT, A.; BILLE, J.; GLAUSER, M.P. Single-dose therapy for oral candidiasis with fluconazole in HIV-infected adults: a pilot study. **J. Infect. Dis.**, **159** (4): 806-807, 1989.
29. COLOMBO, A.L.; BARCHIESI, F.; McGOUGH, D.A.; RINALDI, M.G. Comparison of E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution method for azole antifungal susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol.**, **33** (3): 535-540, 1995.
30. COLOMBO, A.L.; BRANCHINI, M.L.; GEIGER, D.; SCHIMIDT, A.L.; PIGNATARI, A.C.C.; FISCHMAN, O. Gastrointestinal translocation as a possible source of candidemia in an AIDS patient. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **38** (3): 197-200, 1996.
31. COLOMBO, A.L. Teste de sensibilidade a antifúngicos. In: SEDRIM, J.J.C. & MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999. p.: 90-96.
32. COOGAN, M.M.; SWEET, S.P.; CHALLACOMBE, S.J. Immunoglobulin A (IgA), gA1, and IgA2 antibodies to *Candida albicans* in whole and parotid saliva in human immunodeficiency virus infection and AIDS. **Infect. Immun.**, **62** (3): 892-896, 1994.
33. DAROUICHE, R.O. Oropharyngeal and esophageal candidiasis in immunocompromised patients: Treatment issues. **Clin. Infect. Dis.** **26**: 259-274, 1998.
34. DATRY, A. Candidose digestive et infection VIH: actualités cliniques et thérapeutiques. **J. Mycol. Méd.**, **2** (1): 5-14, 1992.
35. DE BERNARDIS, F.; CHIANI, P.; CICCOCCHI, M.; PELLEGRINI, G.; CEDDIA, T.; D'OFFIZI, G.; QUINTI, I.; SULLIVAN, P.A.; CASSONI, A. Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. **Infect. Immun.**, **64** (2): 466-471, 1996.

36. DELLION, S.; IMPROVISI, L.; DUPONT, B.; DROMER, F. Diversity among yeasts isolated from patients with AIDS and oral candidosis: focus on fluconazole susceptibility testing results. **J. Mycol. Méd.**, **5** (2): 98-101, 1995.
37. DEWSNUP, D.H. & STEVENS, D.A. Efficacy of oral amphotericin B in AIDS patients with thrush clinically resistant to fluconazole. **J. Med. Vet. Mycol.**, **32** (5): 389-393, 1994.
38. DIZ DIOS, P.; OCAMPO, A.; MIRALLES, C.; OTERO, I.; IGLESIAS, I.; RAYO, N. Frequency of oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients on protease inhibitor therapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** **87** (4): 437-441, 1999.
39. DRONDA, F.; ALONSO-SANZ, M.; LAGUNA, F.; CHAVES, F.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, A.; VALENCIA, E. Mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* strains in HIV-infected patients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **15** (6): 446-452, 1996.
40. DUPONT, B.; GRAYBILL, J.R.; ARMSTRONG, D.; LAROCHE, R.; TOUZÉ, J.E.; WHEAT, L.J. Fungal infections in AIDS patients. **J. Med. Vet. Mycol.**, **30** (Suppl. 1): 19-28, 1992.
41. DUPONT, B.; DENNING, D.W.; MARRIOTT, D.; SUGAR, A.; VIVIANI, M.A.; SIRISANTHANA, T. Mycosis and AIDS patients. **J. Med. Vet. Mycol.**, **32** (Suppl. 1): 65-77, 1994.
42. DUPONT, B.F.; DROMER, F.; IMPROVISI, L. The problem of azole resistance in *Candida*. **J. Mycol. Méd.**, **6** (suppl. II): 12-19, 1996.
43. ERICSON, T. & MAKINEN, K.K. Saliva: formação, composição e possível função. In: THYLSTRUP, A. & FEJERSKOV, O. **Tratado de Cariologia**. Rio de Janeiro, Cultura Médica, 1988. p. 16 - 32.
44. ESPINEL-INGROFF, A.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V. Comparison of two alternative microdilution procedures with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro testing of fluconazole-resistant and -susceptible isolates of *Candida albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, **33** (12): 3154-3158, 1995.

45. FAN-HAVARD, P.; CAPANO, D.; SMITH, S.M.; MANGIA, A.; ENG, R.H.K. Development of resistance in *Candida* isolates from patients receiving prolonged antifungal therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.** **35** (11): 2302-2305, 1991.
46. FICHTENBAUM, C.J. & POWDERLY, Y.W. Refractory mucosal candidiasis in patients with Human Immunodeficiency Virus Infection. **Clin. Infect. Dis.** **26**: 556-565, 1998.
47. FOX, R.; NEAL, K.R.; LEEN, C.L.; ELLIS, M.E.; MENDAL, B.K. Fluconazole resistant *Candida* in AIDS. **J. Infect.**, **22** (2): 201-204, 1991.
48. FUKAZAWA, Y & KAGAYA, K. Molecular basis of adhesion of *Candida albicans*. **J. Med. Vet. Mycol.** **35**: 87-99, 1997.
49. GALLAGHER, P.J.; BENNETT, D.E.; HENMAN, M.C.; RUSSELL, R.J.; FLINT, S.R.; SHANLEY, D.B.; COLEMAN, D.C. Reduced azole susceptibility of oral isolates of *Candida albicans* from HIV-positive patients and a derivative exhibiting colony morphology variation. **J. Gen. Microbiol.**, **138** (Pt 9): 1901-1911, 1992.
50. GHANNOUM, M.A. Mechanisms potentiating *Candida* infections: a review. **Mycoses**, **31** (11): 543-557, 1988.
51. GRAYBILL, J.R.; VAZQUEZ, J. DAROUICHE, R.O.; MORHART, R.; GREENSPAN, D.; TUAZON, C.; WHEAT, J.; CAREY, J.; LEVITON, I.; HEWITT, R.G.; MAC GREGOR, R.R.; VALENTI, W. RESTREPO, M.; MOSKOVITZ, B.L. Randomized trial of itraconazol oral solution for oropharyngeal candidiasis in HIV/AIDS patients. **Am. J. Med.** **104**: 33-39, 1998.
52. GRAYBILL, J.R. Changing strategies for treatment of systemic mycoses. **Brazilian. J. Infect. Dis.** **4** (2): 47-54, 2000.
53. GREENSPAN, D. Treatment of oral candidiasis in HIV infection. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, **78** (2): 211-215, 1994.

54. GREENSPAN, J.S. & GREENSPAN, D. Oral disease in Human Immunodeficiency infection. In: DE VITA Jr., V.T. **AIDS: Etiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention**. 4. ed., Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997. p.: 355-363.
55. HAY, R.J. Overview of studies of fluconazole in oropharyngeal candidiasis. **Rev. Infect. Dis.**, **12** (suppl. 3): S334-S336, 1990.
56. HEALD, A.E.; COX, G.M.; SCHELL, W.A.; BARTLETT, J.A.; PERFECT, J.R. Oropharyngeal yeast flora and fluconazole resistance in HIV-infected patients receiving long-term continuous versus intermittent fluconazole therapy. **AIDS**, **10** (3): 263-268, 1996.
57. HEINIC, G.S.; STEVENS, D.A.; GREENSPAN, D. MAC PHAIL, L.A.; DODD, C.L.; STRINGARI, S.; STRULL, W.M.; HOLLANDER, H. Fluconazole-resistant *Candida* in AIDS patients: Report of two cases. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, **76** (6): 711-715, 1993.
58. HITCHCOCK, C.A.; PYE, G.W.; TROKE, P.F.; JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **37** (9): 1962-1965, 1993.
59. HOEGL, L.; THOMA-GREBER, E.; RÖCKEN, M.; KORTING, H.C. HIV protease inhibitors influence the prevalence of oral candidosis in HIV- infected patients: a 2-year study. **MYCOSES**, **41**: 321-325, 1998.
60. IMAM, N.; CARPENTER, C.J.; KENNETH, H.M.; FISHER, A.; STEIN, M.; DANFORTH, S.B. Hierarchical pattern of mucosal candidal infection in HIV-seropositive women. **Am. J. Med.**, **89** (2): 142-146, 1990.
61. IMBERT-BERNARD, C.; VALENTIN, A.; REYNES, J.; MALLIÉ, M.; BASTIDE, J.M. Relationship between fluconazole sensitivity of *Candida albicans* isolates from HIV positive patients and serotype, adherence and CD4<sup>+</sup> lymphocyte count. **Eur. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **13** (9): 711-716, 1994.
62. JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W.; LUDER, J.; PORTER, S.R.; SCULLY, C. Emergence of azole resistance in *Candida* species from HIV-infected patients receiving prolonged fluconazole therapy for oral candidosis. **J. Antimicrob. Chemother.**, **35** (1): 103-114, 1995.

63. JUST-NÜBLING, G.; GENTSCHEW, G.; DÖHLE, M.; BÖTTINGER, C.; HELM, E.B.; STILLE, W. Fluconazole in the treatment of oropharyngeal candidosis in HIV-positive patients. **Mycoses**, **33** (9-10): 435-440, 1990.
64. KERRIDGE, D. & NICHOLAS, R.O. Drug resistance in the opportunistic pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **J. Microbiol. Chemother.**, **18** (suppl. B): 39-49, 1986.
65. KITCHEN, V.S.; SAVAGE, M.; HARRIS, F.R.W. *Candida albicans* resistance in AIDS. **J. Infect.**, **22** (2): 204-205, 1991.
66. KLEIN, R.S.; HARRIS, C.A.; SMALL, C.B.; MOLL, B.; LESSER, M.; FRIEDLAND, G.H. Oral candidiasis and high risk patient at the initial manifestations of the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, **311** (6): 354-358, 1984.
67. KORTING, H.C. Clinical spectrum of oral candidosis and its role in HIV-infected patients. **Mycoses**, **32** (suppl. 2): 23-29, 1989.
68. LAGUNA, F.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V.; POLO, R.; VALENCIA, E.; DÍAZ-GUERRA, T.M.; DRONDA, F.; PULIDO, F. Patterns of fluconazole susceptibility in isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans*. **Clin. Infect. Dis**, **24** (2): 124-130, 1997.
69. LANDMAN, D.; SAURINA, G.; QUALE, J.M. Failure of all antifungal therapy for infection due to *Candida albicans*: a new AIDS-related problem? **Clin. Infect. Dis.** **26**: 183-184, 1998.
70. LAROCHE, R.; FLOCH, J.J.; NDABANEZE, E.; KADENDE, P.; KAMANFU, G. Principaux aspects du syndrome d'immunodépression acquise (SIDA) de l'adulte au Burundi. **Med. Trop.**, **48** (4): 359-366, 1988.
71. LE GUENNEC, R.; REYNES, J.; MALLIÉ, M.; PUJOL, C.; JANBON, F.; BASTIDE, J-M. Fluconazole- and itraconazole-resistant *Candida albicans* strains from AIDS patients: multilocus enzyme electrophoresis analysis and antifungal susceptibilities. **J. Clin. Microbiol.**, **33** (10): 2732-2737, 1995.

72. LEVITZ, S.M. Overview of host defenses in fungal infections. **Clin. Infect. Dis.**, **14** (suppl 1): S37-S42, 1992.
73. LOODER, J. Introduction to the chapters IV,V,VI and VII and key to the genera. In:\_\_\_\_-**The Yeasts: a Taxonomic Study**, 2. Ed. North-Holland Publishing Company, Amsterdam,1971. P. 114-120
74. LOURIA, D.B. & BRAYTON, R.G. Behavior of *Candida* cells within leukocytes. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **115**: 93-96, 1964.
75. LYNCH, D.P. Oral candidiasis: history, classification, and clinical presentation. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, **78** (2): 189-193, 1994.
76. MACKOWIAK, P.A. The normal microbial flora. **N. Engl. J. Med.**, **307** (2): 83-93, 1982.
77. MAENZA, J.R.; KERULY, J.C.; MOORE, R.D.; CHAISSON, R.E.; MERZ, R.D.; GALLANT, J.E. Risk factors for fluconazole-resistant candidiasis in human immunodeficiency virus - infected patients. **J. Infect. Dis.**, **173** (1): 219-225, 1996.
78. MAENZA, J.R.; MERZ, W.G.; ROMAGNOLI, M.J.; KERULY, J.C.; MOORE, R.D.; GALLANT, J.E. Infection due to fluconazole-resistant *Candida* in patients with AIDS: Prevalence and Microbiology. **Clin. Infect. Dis.** **24**: 28-34, 1997.
79. McNABB, P.C. & TOMASI, T.B. Host defense mechanisms at mucosal surfaces. **Annu. Rev. Microbiol.**, **35**: 477-496, 1981.
80. MEUNIER, F. Candidiasis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **8** (5): 438-447, 1989.
81. MILAN, E.P. **Estudo microbiológico de leveduras isoladas em cavidade oral de pacientes com AIDS**. São Paulo, 1997. Dissertação (Mestrado), Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.



82. MILLON, L.; MANTEAUX, A.; REBOUX G.; DROBACHEFF, C.; MONOD, M.; BARALE, T.; MICHEL-BRIAND, Y. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. **J. Clin. Microbiol.**, **32** (4): 1115-1118, 1994a.
83. MILLON, L.; REBOUX, G.; BARALE, T. Émergence de *Candida glabrata* et *Candida krusei* chez des patients séropositifs pour le VIH atteints de candidose oropharyngée, traités de façon prolongée par le fluconazole. **J. Mycol. Méd**, **4** (2): 90-92, 1994b.
84. MISHRA, S.K.; SEGAL, E.; GUNTER, E.; KURUP, V.P.; MISHRA, J.; MURALI, P.S.; PIERSON, D.L.; SANDOVSKY-LOSICA, H.; STEVENS, D.A. Stress, immunity and mycotic diseases. **J. Med. Vet. Mycol.**, **32** (suppl 1): 379-406, 1994.
85. MÜLLER, F.; FROLAND, S.S; BRANDTZAEG, P.; FAGERHOL, M.K. Oral candidiasis is associated with low levels of parotid calprotectin in individuals with infection due to Human Immunodeficiency Virus. **Clin. Infect. Dis.**, **16** (2): 301-302, 1993.
86. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Publication of M27-P, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Proposed Standard. **NCCLS**, **12** (25): 1-22, 1992.
87. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Publication of M27-T, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Tentative Standard. **NCCLS**, **15** (10): 1-29, 1995.
88. NEWMAN, S.L.; FLANIGAN, T.P.; FISHER, A.; RINALDI, M.G.; STEIN, M.; VIGILANTE, K. Clinically significant mucosal candidiasis resistant to fluconazole treatment in patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, **19** (4): 684-686, 1994.
89. ODDS, F.C. Factors that predispose the host to candidosis. In: \_\_\_\_\_. **Candida and Candidosis**. 2. ed. London, Baillière Tindall, 1988. p. 93 -116.

90. ODDS, F.C. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. **J. Antimicrob. Chemother.**, **31** (4): 463-471, 1993.
91. ODDS, F.C. & BERNAERTS, R. CHROMagar® *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J. Clin. Microbiol.**, **32** (8): 1923-1929, 1994.
92. OLLERT, M.W.; WENDE, C.; GÖRLICH, M.; McMULLAN-VOGEL, C.G.; ZEPELIN, M.B.; VOGEL, C.; KORTING, H.C. Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. **J. Clin. Microbiol.**, **33** (10): 2543-2549, 1995.
93. OPPENHEIM, F.G.; XU, T.; McMILLIAN, F.M.; LEVITZ, S.M.; DIAMOND, R.D.; OFFNER, G.D.; TROXLER, R.F. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. **J. Biol. Chem.**, **263** (16): 7472-7477, 1988.
94. PALELLA, F.J.; DELANEY, K.M.; MOORMAN, A.C.; LOVELESS, M.O.; FUHRER, J.; SATTEN, G.A.; ASCHMAN, D.J.; HOLMBERG, S.D. and the HIV Outpatient Study Investigators: Declining morbidity and mortality among patients with advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. **N. Engl. J. Med.** **38** (13): 853-860, 1998.
95. PARK, A.W. & YAACOB, H.B. Pathogenic microbes of the oral environment. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.**, **36** (1): 1-33, 1994.
96. PFALLER, M.A.; RHINE-CHALBERG, J.; REDDING, S.W.; SMITH, J.; FARINACCI, G.; FOTHERGILL, A.W.; RINALDI, M.G. Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. **J. Clin. Microbiol.**, **32** (1): 59-64, 1994.
97. PFALLER, M.A.; HOUSTON, A. and COFFMANN, S. Application of CHROMagar *Candida*® for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida kruzei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. **J. Clin. Microbiol.**, **34**(1):58-61, 1996.

98. PFALLER, M.A. Antifungal susceptibility testing: progress and future developments. **Brazilian J. Infect. Dis.**, **4** (2):55-60, 2000.
99. PORTER, S.R.; LUKER, J.; SCULLY, C.; GLOVER, S.; GRIFFITHS, M.J. Orofacial manifestations of a group of British patients infected with HIV-1. **J. Oral Pathol. Med.**, **18** (1): 47-48, 1989.
100. POWDERLY, W.G.; ROBINSON, K.; KEATH, E.J. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: evidence for two patterns of recurrence. **J. Infect. Dis.**, **168** (2): 463-466, 1993.
101. POWDERLY, W.G.; FINKELSTEIN, D.M.; FEINBERG, J. A randomized trial comparing fluconazole with clotrimazole troches for the prevention of fungal infections in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.** **332**: 700-705, 1995.
102. PHILLIPS, P.; DE BEULE, K.; FRECHETTE, G.; TCHAMOUROFF, S.; VANDERCAM, B.; WEITNER, L.; HOELPMAN, A.; STINGL, G.; CLOTET, B. A double-blind comparison of itraconazole oral solution and fluconazole capsules for the treatment of oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.** **26**:1368-1373, 1998.
103. QUEREDA, C.; POLANCO, A.M.; GINER, C.; SÁNCHEZ-SOUSA, A.; PEREIRA, E.; NAVAS, E.; FOTÚN, J.; GUERRERO, A.; BAQUERO, F. Correlation between *in vitro* resistance to fluconazole and clinical outcome of oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis** **15** (1): 30-37, 1996.
104. QUINN, T.C. Global burden of the HIV pandemic. **Lancet**, **348** (9020): 99-106, 1996.
105. REDDING, S.; SMITH, J.; FARINACCI, G.; RINALDI, M.; FOTHERGILL, A.; RHINE-CHALBERG, J.; PFALLER, M. Resistance of *Candida albicans* to fluconazole during treatment of oropharyngeal candidiasis in a patient with AIDS: documentation by *in vitro* susceptibility testing and DNA subtype analysis. **Clin. Infect. Dis**, **18** (2): 240-242, 1994.
106. REEF, S. E. & MAYER, K. H. Opportunistic candidal infections in patients infected with Human Immunodeficiency virus: Prevention issues and priorities. **Clin. Infect. Dis**, **21**(suppl 1):s99-102, 1995.

107. REICHART, P.A.; GELDERBLOM, H.R.; BECKER, J.; KUNTZ, A. AIDS and the oral cavity. The HIV-infection: virology, etiology, origin, immunology precautions and clinical observations in 110 patients. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, **16** (2): 129-153, 1987.
108. REVANKAR, S.G.; KIRKPATRICK, W. R.; McATEE, R. K.; DIB, O. P.; FOTHERGILL, A .W.; REDDING, S. W.; RINALDI, M. G. Detection and significance of fluconazole resistance in oropharyngeal candidiasis in Human Immunodeficiency virus- infected patients. **J. Infect. Dis**,**174**:821-827, 1996.
109. REVANKAR, S. G.; KIRKPATRICK, W. R.; McATEE, R. K.; DIB, O. P.; FOTHERGILL, A .W.; REDDING, S. W.; RINALDI, M. G.;HILSENBECK,S.G.; PATTERSON, T.F. A randomized trial of continuous or intermittent therapy with fluconazole for oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients: clinical outcomes and development of fluconazole resistance. **Am. J. Med.**,**105**:7-11,1998a.
110. REVANKAR, S. G.; DIB, O. P.; KIRKPATRICK, W. R.; McATEE,R. K.; FOTHERGILL, A. W.; RINALDI, M. G.; REDDING,S. W.; PATTERSON,T. F. Clinical evaluation and microbiology of oropharyngeal infection due to fluconazole- resistant *Candida* in Human Immunodeficiency virus-infected patients. **Clin. Infect. Dis.**,**26**: 960-963, 1998b.
111. REX, J.H.; CHESTER, R.; COOPER JR., C.R.; MERZ, W.G.; GALGANI, J.N.; ANAISSIE, E.J. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **39** (4): 906-909, 1995a.
112. REX, J.H.; PFALLER, M.A.; GALGANI, J.N.; BORTLETT, M.S.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M.A.; LANCASTER, M.;ODDS, F.C.; RINALDI, M.G.; WALSH, T.J.; BARRY, A.L. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole and *Candida* infections. **Clin. Infect. Dis.**, **24** (2): 235-247, 1997.
113. REX, J.H.; PFALLER, M.A.; LANCASTER, M.; ODDS, F.C.; BOLMSTRÖN, A.; RINALDI, M.G. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards-recomended broth macrodilution testing of ketoconazole and itraconazole. **J. Clin. Microbiol.**, **34** (4): 816-817, 1996.

114. REX, J.H.; RINALDI, M.G.; PFALLER, M.A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **39** (1): 1-8, 1995b.
115. REYNES, J.; BAZIN, C.; AJANA, F.; DATRY, A.; LE MOING, J.P.; CHWETZOFF, E.; LEVRON, J.C. Pharmacokinetics of itraconazole (oral solution) in two groups of Human Immunodeficiency Virus- infected adults with oral candidiasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **41**(11):24-2558,1997.
116. RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V.; DRONDA, F.; LAGUNA, F.; CHAVES, F.; VALENCIA, E. Correlation of *in vitro* susceptibility test results with clinical response: a study of azole therapy in AIDS patients. **J. Antimicrob. Chemother.**, **35** (6): 793-804, 1995.
117. ROSEFF, Sh.A. & SUGAR, A.M. Oral and esophageal candidiasis. In: BODEY, G.P. **Candidiasis: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment**. 2. ed. Raven Press Ltd., New York, 1993.
118. RUHNKE, M.; EIGLER, A.; ENGELMANN, E.; GEISELER, B.; TRAUTMANN, M. Correlation between antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from patients with HIV infection and clinical results after treatment with fluconazole. **Infection**, **22** (2): 132-136, 1994.
119. SAAG, M.S.; DISMUKE, W.E. Azole antifungal agents: Emphasis on new triazoles. **Antimicrob. Agents Chemother.** **2** (1): 1-8, 1988.
120. SALK, J.; BRETSCHER, P.A.; SALK, P.L.; CLERICI, M.; SHEARER, G.M. A strategy for prophylactic vaccination against HIV. **Science**, **260** (5112): 1270-1272, 1993.
121. SAMARANAYAKE, L.P. Oral mycoses in HIV infection. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, **73** (2): 171-180, 1992.
122. SAMONIS, G.; ROLSTON, K.; KARL, C.; MILLER, P.; BODEY, G.P. Prophylaxis of oropharyngeal candidiasis with fluconazole. **Rev. Infect. Dis.**, **12** (3): S369-S373, 1990.
123. SANGEORZAN, J.A.; BRADLEY, S.F.; HE, X.; ZARINS, L.T.; RIDENOUR, G.L.; TIVALLI, R.N.; KAUFFMAN, C.A. Epidemiology of oral candidiasis and

HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. **Am. J. Med.**, **97** (4): 339-346, 1994.

124. SANGIARD, D.; KUCHLER, K.; ISCHER, F.; PAGANI, J.L.; MONOD, M.; BILLE, J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **39** (11): 2378-2386, 1995.
125. SANGUINETI, A.; CARMICHAEL, K.; CAMPBELL, K. Fluconazole resistant *Candida albicans* after long-term suppressive therapy. **Arch. Intern. Med.** **153**: 1122-1124, 1993.
126. SCHULTEN, E.A.; TEN KATE, R.W.; VAN DER WALL, I. Oral manifestations of HIV infection in 75 Dutch patients. **J. Oral Pathol. Med.**; **18** (1): 42-46, 1989.
127. SOCRANSKY, S.S. & MANGANIELLO, S.D. The oral microbiota of man from birth to senility. **J. Periodontol**, **42** (8): 485-496, 1971.
128. STEINBAKK, M.; NAESS-ANDRESEN, C.F.; LINGAAS, E.; DALE, I.; BRANDTZAEG, P.; FAGERHOL, M.K. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. **Lancet**, **336** (8718): 763-765, 1990.
129. ST-GERMAIN, G.; DION, C.; ESPINEL-INGROFF, A.; RATELLE, J.; REPENTIGNY, L. Ketoconazole and itraconazole susceptibility of *Candida albicans* isolated from patients infected with HIV. **J. Antimicrob. Chemother.**, **36** (1): 109-118, 1995.
130. SWEET, S.P.; COOKSON, S.; CHALLACOMBE, S.J. *Candida albicans* isolates from HIV-infected and AIDS patients exhibit enhanced adherence to epithelial cells. **J. Med. Microbiol.**, **43** (6): 452-457, 1995.
131. TAVITIAN, A.; RAUFMAN, J-P; ROSENTHAL, L.E.; WEBER, J.; WEBBER, C.A.; DINCISOY, H.P. Ketoconazole-resistant *Candida* esophagitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Gastroenterology**, **90** (2): 443-445, 1986.
132. TORRES-RODRÍGUEZ, J.M. Nuevos hongos patógenos oportunistas emergentes. **Rev. Iberoamer. Micol.**, **13** (suppl. 1): S30-S38, 1996.

133. TOSH, F.D. & DOUGLAS, L.J. Characterization of a fucoside-binding adhesin of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, **60** (11): 4734-4739, 1992.
  
134. TROILLET, N.; DURUSSEL, C.; BILLE, J.; GLAUSER, M.P.; CHAVE, J.P. Correlation between *in vitro* susceptibility of *Candida albicans* and fluconazole-resistant oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** **12** (12): 911-915, 1993.
  
135. UNAIDS, JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. Global summary of the HIV/AIDS epidemic: December 1998. London, 24 November 1998. <http://www.unaids.org>.
  
136. VANDEN BOSSCHE, H.; WARNOCK, D.W.; DUPONT, B.; KERRIDGE, D.; SEN GUPTA, S.; IMPROVISI, L.; MARICHAL, P.; ODDS, F.C.; PROBOST, F.; RONIN, O. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. **J. Med. Vet. Mycol.**, **32** (suppl. 1): 189-202, 1994.
  
137. VAN DER WALT, J.P. Criteria and methods used in classification. In: LODDER, J., ed. **The Yeasts: a Taxonomic Study**, 2. ed. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1971a. p. 35-113.
  
138. VAN DER WALT, J.P. Discussion of the genera belonging to the ascomycetous yeasts: Genus 16. *Saccharomyces* Meyen emend. Rees. In: LODDER, J., ed. **The Yeasts: a Taxonomic Study**, 2. ed. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1971b. p. 555-718.
  
139. VAN UDEN, N. & BUCKLEY, H. Discussion of the genera of asporogenous yeasts not belonging to the sporobolomycetaceae: Genus 2. *Candida* Berkout. In: LODDER, J., ed. **The Yeasts: a Taxonomic Study**, 2. ed., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1971. p. 893-1082.
  
140. VAN UDEN, N. & VIDAL-LEIRIA, M. Discussion of the genera of asporogenous yeasts not belonging to the sporobolomycetaceae: Genus 10. *Torulopsis* Berlese. In: LODDER, J., ed. **The Yeasts: a Taxonomic Study**, 2. ed., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1971. p. 1235-1308.
  
141. VELEGRAKI, A. *In vitro* susceptibility to itraconazole and fluconazole of switch phenotypes of *Candida albicans* serotypes A and B, isolated from immunocompromised hosts. **J. Med. Vet. Mycol.**, **33** (1): 83-85, 1995.

142. VITTINGHOFF, E.; SCHEER, S.; O'MALLEY, P.; COLFAX, G.; HOLMBERG, S.D.; BUCHBINDER, S.P. Combination antiretroviral therapy and recent declines in AIDS incidence and mortality. **J. Infect. Dis.**, **179**:717-720, 1999.
143. VUDHICHAMNONG, K.; WALKER, D.M.; RYLEY, H.C. The effect of secretory immunoglobulin A on the *in vitro* adherence of the yeast *Candida albicans* to human epithelial cells. **Arch. Oral. Biol**, **27** (8): 617-621, 1982.
144. VUFFRAY, A.; DURUSSEL, C.; BOERLIN, P.; BOERLIN-PETZOLD, F.; BILLE, J.; GLAUSER, M.P.; CHAVE, J.P. Oropharyngeal candidiasis resistant to single-dose therapy with fluconazole in HIV-infected patients [letter]. **AIDS**, **8** (5): 708-709, 1994.
145. WANGER, A.; MILLS, K.; NELSON, P.W.; REX, J.H. Comparison of E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Microdilution Method for Antifungal Susceptibility Testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **39** (11): 2520-2522, 1995.
146. WEINERT, M.; GRIMES, R.M.; LYNCH, D. Oral manifestations of HIV infection. **Ann. Intern. Med.** **125** (6): 485-496, 1996.
147. WHITE, A.; GOETZ, M.B. Azole resistant *Candida albicans*: report of two cases of resistance to fluconazole and review. **Clin. Infect. Dis.** **19**: 687-692, 1994.
148. WILLOCKS, L.; LEEN, C.L.S.; BRETTLE, R.P.; URQUHART, D.; RUSSELL, T.B.; MILNE, L.J.R. Fluconazole resistance in AIDS patients. **J. Anticrib. Chemother.** **28** (6): 937-939, 1991.
149. WORLD HEALTH ORGANIZATION: AIDS-global data. **Wkly. Epidemiol. Rec**, **70** (50): 353-354, 1995.
150. WU, T.; SAMARANAYAKE, L.P.; CAO, B.Y.; WANG, J. In-vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. **J. Med. Microbiol.**, **44** (4): 311-316, 1996.



151. XU, T.; LEVITZ, S.M.; DIAMOND, R.D.; OPPENHEIM, F.G. Anticandidal activity of major human salivary histatins. **Infect. Immun.**, **59** (8): 2549-2554, 1991.
152. XU, T.; TELSER, E.; TROXLER, R.F.; OPPENHEIM, F.G. Primary structure and anticandidal activity of the major histatin from parotid secretion of the subhuman primate, *Macaca fascicularis*. **J. Dent. Res.**, **69** (11): 1717-1723, 1990.